

Isolierung und Charakterisierung
des nativen Halorhodopsins
aus *Halobacterium halobium*

Michael Steiner

Diss. München
1984



Isolierung und Charakterisierung
des nativen Halorhodopsins
aus *Halobacterium halobium*

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Michael Steiner

München 1983

1. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Oesterhelt
2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Februar 1984

Ein Teil der hier vorgelegten Ergebnisse wurde bereits veröffentlicht:

(1) Peter Hegemann, Michael Steiner and Dieter Oesterhelt

"Isolation and characterization of the retinal-binding component of halorhodopsin."

EMBO-Journal 1, 1177-1183 (1982)

(2) Michael Steiner and Dieter Oesterhelt

"Isolation and properties of the native chromoprotein halorhodopsin."

EMBO-Journal 2, 1379-1385 (1983)

(3) Michael Steiner, Dieter Oesterhelt, Masahiro Arikawa and Janos K. Lanyi

"Halide binding by the purified halorhodopsin chromoprotein. I. Effects on the chromophore."

Journal of Biological Chemistry (1983), in press

(4) Joseph J. Falke, Sunney I. Chan, Michael Steiner, Dieter Oesterhelt, Paul Towner and Janos K. Lanyi

"Halide binding by the purified halorhodopsin chromoprotein. II. New chloride binding sites revealed by ^{35}Cl NMR."

Journal of Biological Chemistry (1983), in press

Meiner Frau Burgl

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG	5
2.1 Bacteriorhodopsin	5
2.2 Lichtinduzierte Protonenverschiebungen in Halobacterien	8
2.3 Halorhodopsin	9
3. ERGEBNISSE	16
3.1 Bakterienzucht	16
3.1.1 Mutanten	16
3.1.2 Halorhodopsin-Aktivitätstest	17
3.1.3 Wachstumsoptimierung	19
3.2 Isolierung des Halorhodopsins	23
3.2.1 Membranfraktionierung	23
3.2.2 Chromatographische Anreicherung	27
3.3 Charakterisierung des Halorhodopsins	37
3.3.1 Allgemeine Charakterisierung	37
3.3.2 Untersuchungen zum 410 nm Chromophor	57
3.3.3 Untersuchungen zu Anionenbindungsstellen	70
3.3.4 Strukturelle Untersuchungen	88
3.4 Isolierung eines blauen Cu-bindenden Proteins	98
4. DISKUSSION	106
5. MATERIAL UND METHODEN	114
5.1 Material	114
5.2 Bakterienzucht	115
5.2.1 Bakterienstämme	115
5.2.2 Zucht der Bakterien	115
5.2.3 Wachstumskurve der Bakterienkultur	116
5.3 Proteinisolierungen	117
5.3.1 Isolierung des Halorhodopsins	117
5.3.2 Isolierung des Bacteriorhodopsins	120
5.3.3 Zellvesikelbereitung	120
5.3.4 Isolierung eines blauen Cu-bindenden Proteins	121
5.4 Spektroskopische Untersuchungen	122
5.4.1 Absorptionsspektren	122

5.4.2	Spektrophotometrische Tests für	122
	Halorhodopsin	123
5.4.3	Untersuchungen zum 410 nm Chromophor	124
5.4.4	Untersuchungen zum Photozyklus	127
5.4.5	^{35}Cl NMR Spektroskopie	128
5.4.6	ESR Spektroskopie	129
5.5	Chemische Untersuchungen	129
5.5.1	Reduktion von Halorhodopsin mit	129
	Natriumborhydrid	129
5.5.2	Bleichung von Halorhodopsin mit	129
	Hydroxylamin	129
5.6	Strukturelle Untersuchungen	130
5.6.1	CD-Spektroskopie	130
5.6.2	Rekonstitutionsversuche mit Lipiden	130
5.6.3	Elektronenmikroskopie	131
5.7	Analytische Methoden	131
5.7.1	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	131
5.7.2	2-dimensionale Polyacrylamidgel-Elektrophorese	131
5.7.3	Gelfiltration	132
5.7.4	Proteinbestimmung	132
5.7.5	Octylglucosidbestimmung	133
5.7.6	Salz-Bestimmung	133
5.7.7	Bestimmung des Cu-Gehaltes	133
6.	LITERATUR	134
7.	ABKÜRZUNGEN	148

1. ZUSAMMENFASSUNG

Über die Funktion und Eigenschaften des retinalbindenden Proteins Halorhodopsin (HR) aus Halobacterium halobium, das als eine lichtgetriebene Chloridpumpe funktioniert, war zu Beginn dieser Arbeit nur wenig bekannt. Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, dieses membrangebundene Transportprotein nativ zu isolieren und seine Eigenschaften und Funktion zu beschreiben. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- (1) Die Bakterienzucht der Bacteriorhodopsin-freien Halobacterium halobium Stämme L-33 und OD2 wurde optimiert und ergab eine maximale Ausbeute an Halorhodopsin von 5 bzw. 10 % bezogen auf die Menge an Bacteriorhodopsin (BR) aus dem Stamm S9. Es wurde eine Methode zur Isolierung des nativen Halorhodopsins erarbeitet: nach Waschen einer Zellmembranfraktion mit Tween 20 und Solubilisierung in Lubrol PX bei hoher Ionenstärke ergab Chromatographie über Phenyl-Sepharose und Hydroxylapatit ein 230 fach angereichertes Protein in 60 % Ausbeute.
- (2) In SDS-Polyacrylamidgel-Elektropherogrammen zeigte Halorhodopsin eine Doppelbande mit scheinbaren Molekulargewichten von 19.000 und 20.000 Dalton und verhielt sich in Gelfiltrationsexperimenten wie solubilisiertes Bacteriorhodopsin. Das Chromoprotein

ist in Salzlösungen ($>0,1 \text{ M NaCl}$) mit oder ohne Octylglucosid stabil. Halorhodopsin reagierte mit Natriumborhydrid im Dunkeln zu einem fluoreszierenden Retinylprotein und mit Hydroxylamin im Licht zu Retinaloxim. Die Retinalbindungsstelle des Chromoproteins ist deshalb wahrscheinlich die Aminogruppe eines Lysinrestes. Der Chromophor des Halorhodopsins besitzt ein Absorptionsmaximum bei $580 \pm 2 \text{ nm}$ und einen Extinktionskoeffizienten von $50.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Wie membrangebundenes Halorhodopsin durchläuft auch das gereinigte Chromoprotein zwei verschiedene Photozyklen (beide mit einer Halbwertszeit von 10 msec bei RT). Dabei treten als langsamste Intermediate in Gegenwart von Chlorid P_{520} und in chloridfreien Medium P_{660} auf.

- (3) Halorhodopsin besitzt mehrere Anionenbindungsstellen, wie anhand verschiedener Experimente nachgewiesen werden konnte: a) Versuche zum Photozyklus, b) Untersuchung eines $\text{HR}_{580}/\text{DHR}_{410}$ -Gleichgewichts und c) ^{35}Cl NMR Spektroskopie. Die untersuchten Anionen ließen sich in vier Klassen unterteilen: Halogenide (ohne Fluorid), Pseudohalogenide, einwertige Anionen und mehrwertige Anionen.

- Versuche zum Photozyklus zeigten, daß nur die Halogenide mit einer Bindungskonstanten von 10 mM das Intermediat P_{520} bilden. Die anderen Klassen von Anionen verkleinern als kompetitive Inhibitoren der Halogenide mit unterschiedlichen Affinitäten die P_{520} -Bildung.

- Beim Halorhodopsin unterliegt die Verschiebung des $HR_{580}/D_{HR_{410}}$ -Gleichgewichts und die Rotverschiebung der 580 nm Chromophorabsorptionsbande durch die untersuchten Anionen keiner erkennbaren Regel. Die Bindungskonstanten liegen im Bereich von 10 mM.

- In ^{35}Cl NMR Experimenten wurde Chloridbindung an das Halorhodopsin mit zwei verschiedenen Affinitäten ($K_D = 100$ mM und >1 M) und eine Kompetition dieser Bindung durch eine Reihe von Anionen mit unterschiedlicher Spezifität gezeigt.

Bacteriorhodopsin zeigt erwartungsgemäß unter gleichen Bedingungen keine Affinität zu Halogeniden.

- (4) Der Chromophor des Halorhodopsins wird reversibel durch alkalischen pH in einen 410 nm Chromophor umgewandelt. Diese Spezies wird auch bei Belichtung unter gleichzeitiger Protonenabgabe gebildet. Die thermische Rückbildung zum 580 nm Chromophor erfolgt langsam mit einer Halbwertszeit von 54 sec ($5^{\circ}C$) und wird durch Blaulicht beschleunigt. Die Reaktion ähnelt der bereits bekannten reversiblen Bleichung des Bacteriorhodopsins, in der ebenfalls unter Protonenabspaltung ein blauverschobenes Intermediat bei 412 nm gebildet wird.

- (5) CD Spektren des Halorhodopsins, aufgenommen unter identischen Bedingungen wie für Bacteriorhodopsin, lassen einen α -Helixgehalt von ca. 85 % abschätzen, wenn Bacteriorhodopsin mit 72 % als Referenz angesetzt wird. Die CD Spektren der Halorhodopsinproben aller

Anreicherungsstufen zeigten im sichtbaren Bereich immer eine Excitonkopplung, die für die trimeren Bacteriorhodopsinkomplexe der Purpurmembran als eine enge Wechselwirkung der Chromophore diskutiert wird. Ob deshalb Halorhodopsin ebenfalls aus trimeren Einheiten aufgebaut ist, bleibt offen. Halorhodopsin konnte durch Entfernen des Detergenz in Gegenwart von Halobakterienlipiden in eine membranartige Struktur eingebaut werden, die im Elektronenmikroskop sichtbar wird.

Der Vergleich von Halorhodopsin mit Bacteriorhodopsin insgesamt zeigt einerseits starke Ähnlichkeiten der chromophoren Gruppen und einiger Strukturelemente, andererseits besitzen die Chromoproteine verschiedene Primärstrukturen und andere Ionenspezifitäten in ihrer Funktion. Ein detaillierter Vergleich beider Moleküle könnte zukünftig erheblich zum Verständnis des Mechanismus von Ionenpumpen beitragen.

2. EINLEITUNG

Seit Matsuno-Yagi und Mukohata (1977) die Existenz eines anderen Bacteriorhodopsins, verschieden von dem in der Purpurmembran, postulierten, ist nur wenig über die Eigenschaften und Struktur dieses neuen retinalbindenden Proteins aus Halobacterium halobium, Halorhodopsin genannt (Mukohata et al., 1980), bekannt geworden. Dagegen wurden viele Experimente zur Funktion des Halorhodopsins in Zellen und Zellvesikeln durchgeführt, bis es schließlich als eine lichtgetriebene Chloridpumpe identifiziert wurde (Schobert und Lanyi, 1982). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Halorhodopsin in nativer Form zu isolieren sowie die Eigenschaften und einen möglichen Mechanismus dieser bisher ersten bekannten lichtgetriebenen Anionenpumpe zu beschreiben.

2.1 Bacteriorhodopsin

Die Zellmembran der Halobakterien besteht teilweise aus inselförmigen kristallinen Membranbereichen, die Purpurmembran genannt wird. Diese enthält, neben 25 % Lipidanteil, zu 75 % einen purpurfarbenen Retinal-Protein-Komplex, das Bacteriorhodopsin. Zur Struktur und Funktion der Purpurmembran erschienen zahlreiche Übersichtsartikel (Henderson, 1977; Stoeckenius et al., 1979; Eisenbach und Caplan, 1979).

Die Isolierung der Purpurmembran aus der umgebenden

Zellmembran erfolgt durch Lyse der Zellen in Wasser und anschließende Dichtegradienten-Zentrifugation, die die Purpurmembran als violette Fraktion vom Rest der Zellmembranfragmente abtrennt. Dadurch werden Untersuchungen an dieser chemisch homogenen Membranfraktion auf einfache Weise möglich.

Bacteriorhodopsin besteht aus einem integralen Membranprotein (eine Polypeptidkette), dem Bacterio-opsin, und einer chromophoren Gruppe, dem Retinal (Oesterhelt und Stoeckenius, 1971). Beide Komponenten sind durch eine kovalente Bindung zwischen dem Stickstoff des Lysinrestes 216 am Protein und dem 15-C-Atom des Retinals verbunden (Lemke und Oesterhelt, 1981; Bayley et al., 1981; Mullen et al., 1981).

Bacteriorhodopsin diffundiert nicht wie die meisten integralen Membranproteine lateral in der Lipidphase der Membran, sondern bildet in der Purpurmembran einen zweidimensionalen hexagonalen Kristall, der aus Trimeren aufgebaut wird. Henderson und Unwin (1975) postulierten ein Strukturmodell des Bacteriorhodopsins, dessen besondere Charakteristik sieben α -Helices sind, die senkrecht zur Membranebene stehen.

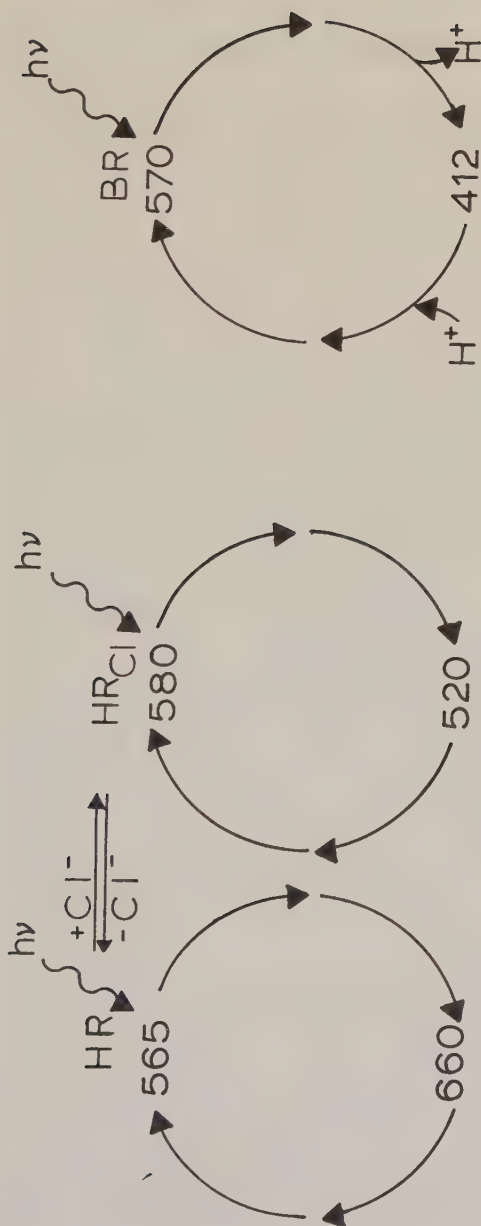


Abb. 1: Vereinfachte Darstellung der Photozyklen des Halorhodopsins und des Bacteriorhodopsins aus *Halobacterium halobium* mit ihren wesentlichen Intermediaten. Im Gegensatz zum Bacteriorhodopsin zeigt der Photozyklus von Halorhodopsin eine starke Chlorid-abhängigkeit. HR: chloridfreies Halorhodopsin, HR_{Cl} : Halorhodopsin in Gegenwart von Chlorid und BR: Bacteriorhodopsin. Die Zahlen geben die Absorptionsmaxima der Ausgangszustände und der Intermediate wieder. Bei Raumtemperatur und Lichtsättigung werden alle Photozyklen mit etwa der gleichen Frequenz (200 sec⁻¹) durchlaufen. Im Bacteriorhodopsin ist der Protonentransport an die Bildung des 412 nm Intermediats gekoppelt. Dagegen sind im Halorhodopsin die Transportschritte für Chlorid noch nicht aufgeklärt. Sicher ist nur, daß HR_{Cl} die Transport-aktive Form ist.

2.2 Lichtinduzierte Protonenverschiebungen in Halobacterien

Die Purpurmembran funktioniert als eine lichtgetriebene Protonenpumpe (Oesterhelt, 1972; Oesterhelt und Stoeckenius, 1974). Durch die Absorption von Licht wird ein photochemischer Zyklus induziert (Abb. 1), an den die Translokation eines Protons vom Cytoplasma in das Medium gekoppelt ist. Die Folge ist ein elektrochemisches Potential, das nach der chemiosmotischen Hypothese (Mitchell, 1977) einerseits zur ATP-Synthese (Danon und Stoeckenius, 1974; Oesterhelt, 1974), andererseits aber auch zu Ionenaustausch (Oesterhelt et al., 1978), Aminosäureaufnahme (Lanyi, 1979) sowie anderen bioenergetischen Prozessen der Zelle genutzt werden kann. Die Photophosphorylierung wird nicht durch Inhibitoren der Atmungskette (Cyanid) beeinflusst, aber durch Protonophore (CCCP) gehemmt. Dies war der erste Beweis für eine lichtgetriebene, aber vom Elektronentransport unabhängige Ionentranslokation. Als isolierter Prozeß konnte die Wirkung der Protonenpumpe Bacteriorhodopsin durch Fusion des reinen Chromoproteins mit Liposomen gezeigt werden (Racker und Stoeckenius, 1974; Kayuschin und Skulachev, 1974; Yoshida et al., 1975).

Bacteriorhodopsin als eine auswärts gerichtete Protonenpumpe sollte in Halobacterienzellen nach Absättigung aller Bacteriorhodopsin-abhängigen Prozesse entweder keine pH-Änderung oder eine Azidifizierung zeigen. Dies entspricht jedoch nicht der Realität, da bei Belichtung der Zellsuspensionen vor der erwarteten Azidifizierung eine

Alkalinisierung zu messen ist. Dieses "alkalische Überschießen" wurde auf sehr unterschiedliche Ursachen zurückgeführt: a) ein bereits existierender pH-Gradient, der vorübergehend kleiner wird (Oesterhelt und Stoeckenius, 1973; Bogomolni et al., 1976), b) eine Protonenaufnahme der Zelle durch stöchiometrischen Verbrauch während der ATP-Synthese (Oesterhelt, 1975) oder c) die Existenz eines elektrogenen H^+/Na^+ -Antiporters (Hartmann und Oesterhelt, 1977; Lanyi und MacDonald, 1976). Keine dieser Erklärungen vermochte jedoch den Effekt befriedigend zu deuten.

Einen völlig neuen Gesichtspunkt erbrachte der Vergleich der lichtinduzierten Änderungen des pH-Wertes im Medium und des ATP-Spiegels in Zellen von zwei verschiedenen Halobacterienstämmen mit unterschiedlicher Pigmentierung. Rote, Bacteriorhodopsin-freie Zellen zeigten nur eine Alkalinisierung, der in Bacteriorhodopsin-haltigen Zellen wie erwartet eine Azidifizierung folgte. Eine Vorinkubation der Zellen für 5 min bei 75°C unterdrückte den pH-Anstieg in beiden Zelltypen. Ebenso führte eine Vorbelichtung in Gegenwart von Hydroxylamin zu einem Ausbleiben der Alkalinisierung. Aufgrund dieser Ergebnisse postulierten Matsuno-Yagi und Mukohata (1977) die Existenz eines "zweiten Bacteriorhodopsins", verschieden von dem in der Purpurmembran.

2.3 Halorhodopsin

Das Postulat eines "zweiten Bacteriorhodopsins" mit anderen Eigenschaften führte zu vielen Untersuchungen über

die mögliche Funktion dieses zweiten Pigments in Halobakterien. Zunächst wurde ihm die Eigenschaft einer auswärts gerichteten, lichtgetriebenen Natriumpumpe zugeschrieben (Lindley und MacDonald, 1979) und der Name Halorhodopsin vorgeschlagen (Mukohata et al., 1980). Evidenzen für diese Funktion hatten hauptsächlich Versuche mit Zellvesikeln erbracht, in denen ein lichtinduzierter und Entkoppler-insensitiver Natriumtransport, begleitet von einer starken passiven Protonenaufnahme, beobachtet wurde (MacDonald et al., 1979; Greene und Lanyi, 1979; Matsuno-Yagi und Mukohata, 1980). In Vesikeln aus dem Wildtyp, der beide Pigmente enthielt, konnte damit das "alkalische Überschießen" als eine durch Halorhodopsin/Antiporter induzierte passive Protonenbewegung, die nachfolgende Azidifizierung dagegen als eine aktive Protonenbewegung durch Bacteriorhodopsin/ K^+ -Transport charakterisiert werden (Abb. 2). Aktionsspektren der beiden Prozesse belegten für die Alkalinisierung in der Tat ein Maximum bei 580 - 585 nm, verschieden vom Bacteriorhodopsin.

Ein wesentlicher Fortschritt der Erkenntnis wurde durch neue Bacteriorhodopsin-freie Mutanten wie den Stamm L-33 erreicht (Wagner et al., 1981). Arbeiten mit diesem Halobakterienstamm konnten die Existenz der Natriumpumpe nicht bestätigen, sondern deuteten darauf hin, daß Halorhodopsin als eine nach innen gerichtete lichtgetriebene Chloridpumpe arbeitet (Schobert und Lanyi, 1982). Dabei war der Aufbau eines Membranpotentials, die Volumenzunahme und die Transportaktivität in Zellvesikeln nur abhängig von der

Die Funktion von Halorhodopsin als Anionenpumpe eröffnet einen neuen Aspekt seiner möglichen physiologischen Bedeutung. Während des Zellwachstums findet eine starke Volumenvergrößerung statt, die zwangsläufig eine in Halobakterien besonders hohe Nettosalzaufnahme notwendig macht. Das Membranpotential der Halobacterienzelle, außen positiv und innen negativ, kann Kationen direkt über spezifische Carrier (Ionophore) in das Zellinnere fördern. Der Anionentransport dagegen muß als gekoppelter Ionentransport stattfinden oder wie im Fall des Halorhodopsins als primärer ("Pump-") Prozess (Abb. 2). Da Halobakterien auch im Dunkeln bei limitierter Belüftung wachsen, muß die Atmung über ein noch unbekanntes Carriersystem eine Chloridaufnahme treiben können. Halorhodopsin kann also wie Bacteriorhodopsin unter aeroben Bedingungen wie eine Art Hilfsmotor der Zelle angesehen werden.

Untersuchungen zur Photophosphorylierung zeigten, daß Halorhodopsin als Licht-Energiewandler zwar ATP synthetisieren, aber nicht (im Gegensatz zum Bacteriorhodopsin) als ein photosynthetisches Pigment funktionieren kann. Ein phototrophes Wachstum mit Halorhodopsin allein (ohne Bacteriorhodopsin unter anaeroben Bedingungen) ist daher nicht möglich (Wagner et al., 1981). Der in die Zelle gerichtete Chloridtransport hätte eine starke Azidifizierung des Zellinnern durch Protoneneinfluß während der ATP-Synthese zur Folge und würde folglich zum Tod der Zelle führen. Dieser Effekt kann durch Zugabe von Protonophoren (CCCP) verstärkt werden und bietet damit eine Möglichkeit

der Selektion von Mutanten (Flx-Mutanten), die keine lichtgetriebenen Ionenpumpen mehr enthalten (Spudich und Spudich, 1982).

Die Isolierung von Bacteriorhodopsin- und Bacterioruberin-freien Mutanten ermöglichte eine spektrophotometrische Identifizierung des Halorhodopsins (Lanyi und Weber, 1980). Durch Bleichen von Zellvesikelpräparationen mit Hydroxylamin im Licht wurde mit Differenzspektroskopie eine Absorption bei 588 nm nachgewiesen, die dem Maximum aus den Aktionsspektren der Zellen bei 585 nm sehr nahe kam. Das hitzelabile Pigment hatte einen Extinktionskoeffizienten von $48.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Halorhodopsin durchläuft wie Bacteriorhodopsin einen Photozyklus mit einer Halbwertszeit von 10 msec (Abb. 1), unterscheidet sich aber mit anderen Intermediaten im Photozyklus vom Bacteriorhodopsin (Bogomolni et al., 1981). Versuche mit Zellvesikeln in Abwesenheit und Gegenwart von Chlorid zeigten die Existenz zweier Photozyklen und damit Halogenidbindungsstellen, die das photochemische Verhalten von Halorhodopsin beeinflussen (Schobert et al., 1983).

Alle bisherigen Untersuchungen konnten noch keinen Aufschluß über die molekularen Eigenschaften des neuen Chromoproteins geben. Mit retinalfreien, aber viel Halo-opsin synthetisierenden Mutanten, konnte das retinalbindende Protein identifiziert werden. Nach Rekonstitution mit Tritium-markierten Retinal, Reduktion mit Cyanoborhydrid und SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurde ein einziges Retinylprotein mit einem scheinbaren Molekulargewicht von ca. 20.000

Dalton gefunden (Lanyi und Oesterheld, 1982). Das Pigment wurde nach Markierung mit radioaktiven Retinal und Solubilisierung in SDS denaturiert angereichert (Hegemann et al., 1982). Bromcyanspaltung der isolierten Polypeptidkette und Sequenzanalyse zeigte eine Primärstruktur des Halorhodopsins, die von der des Bacteriorhodopsins (Hegemann, 1984) verschieden ist.

Um die Funktion der lichtgetriebenen Chloridpumpe selbst untersuchen zu können, mußte das Chromoprotein in aktiver Form isoliert werden. Da kein Aktivitätstest für das intakte Transportsystem Halorhodopsin zur Verfügung steht, sobald die Zellvesikel aufgelöst wurden, wurde versucht das Chromoprotein unter Erhalt seiner charakteristischen violetten Farbe, d.h. nativ anzureichern (Steiner und Oesterheld, 1983) und zu charakterisieren (Steiner et al., 1983; Falke et al., 1983a). Diese Untersuchungen werden in der vorliegenden Arbeit vorgestellt. Nach Rekonstitution des gereinigten Halorhodopsins in künstliche Lipidvesikel wurde anhand von Experimenten mit schwarzen Lipidmembranen ein lichtgetriebener Anionentransport in diesen Proteoliposomen nachgewiesen. Das 20.000 Dalton Chromoprotein ist daher die funktionelle Chloridpumpe (Bamberg et al., 1984).

1982 wurde in Halobakterien noch ein drittes retinalbindendes Protein mit anderen Eigenschaften als Halorhodopsin und Bacteriorhodopsin entdeckt. Es wurde "Slow cycling Rhodopsin" genannt, da es photochemisch ein Intermediat bildet, das erst im sec Bereich in den Ausgangszustand zurückkehrt (Bogomolni und Spudich, 1982; Tsuda et al.,

1982). Das neue Pigment arbeitet wahrscheinlich als einer der Photorezeptoren für die Phototaxie der Halobakterien. Anhand der unterschiedlichen Eigenschaften konnte gezeigt werden, daß "Slow cycling Rhodopsin" bei den hier beschriebenen Untersuchungen des nativen Halorhodopsins nicht störte.

3. ERGEBNISSE

3.1 Bakterienzucht

3.1.1 Mutanten

Das native Halorhodopsin konnte aus Mutanten mit besonderen Eigenschaften isoliert werden, die keinen nennenswerten Bacteriorhodopsin- (<1 %) und einen besonders hohen Halorhodopsingehalt hatten. Im Labor von Oesterhelt stand zu Beginn der Untersuchungen ein solcher Stamm, die Halobacterium halobium Mutante L-33 (Wagner et al., 1981), zur Verfügung. Sie hatte eine hohe Aktivität der lichtgetriebenen Chloridpumpe Halorhodopsin, gemessen als lichtinduzierte passive Protonenaufnahme der Zellen in Gegenwart eines Entkopplers. Außerdem erleichtert das Fehlen des orangeroten Bacterioruberins (C₅₀ Carotenoid) wesentlich die Analyse des Chromoproteins in isolierten Zellmembranen mittels spektrophotometrischer Messungen.

Ab Juli 1983 war ein weiterer Stamm (OD2) verfügbar, der gegenüber L-33 Zellen mehr als doppelt so viel Halorhodopsin produziert (Bogomolni und Spudich, 1982). Störendes Bacterioruberin konnte während der Anreicherung quantitativ abgetrennt werden. Durch diese Mutante wurde eine Halorhodopsininisolierung in hohen Ausbeuten möglich.

Tabelle I vergleicht den Pigmentgehalt und andere Eigenschaften der verwendeten Halobacterium halobium Stämme.

Tabelle I: Phänotypus verschiedener Halobacterium halobium Stämme.

Mutante	Pigmente	Farbe
Wildtyp	HR ⁺ BR ⁺ SR ⁺ Rub ⁺¹	rosa
S9	HR ⁺ BR ⁺⁺ SR ⁺ Rub ⁽⁺⁾	violett
R1M1	HR ⁺ BR ⁺ SR ⁺ Rub ⁽⁺⁾	rot-violett
L-33	HR ⁺ BR ⁻ SR ⁺ Rub ⁻	farblos
OD2	HR ⁺⁺ BR ⁻ SR ⁺ Rub ⁺	orangerot
L-07 ²	HO ⁺ BO ⁻ SO ⁺ Rub ⁻	farblos
Flx3	HR ⁻ BR ⁻ SR ⁺ Rub ⁺	orangerot

Die Angaben zu den Pigmenten bedeuten: X⁺ = Komponente X enthalten; X = Gehalt der Komponente X unter der Nachweisgrenze (1 %); ++ = Überproduktion des Chromoproteins; (+) = nur wenig, d.h. zu 5 - 10 % vorhanden. ¹ = C₅₀ Carotenoid Bacterioruberin; ² = L-07 synthetisiert kein Retinal und enthält nur die entsprechenden Opsine.

3.1.2 Halorhodopsin-Aktivitätstest

Da in Zellen die Chromoproteinkonzentration für direkte spektrophotometrische Bestimmungen zu gering war, wurde der Halorhodopsingehalt mit einer Transportmessung bestimmt. Aufbauend auf der Methode von Oesterheld (1982), wurde ein Test entwickelt, der es erlaubte, die Halorhodopsinaktivität von wachsenden Zellkulturen einfach und schnell zu ermitteln. Durch Zugabe eines Protonophors (CCCP) wird die Zellmembran für Protonen so permeabel gemacht, daß der

Rückstrom von Protonen wesentlich schneller erfolgt als der lichtgetriebene Transport von Chlorid. Die Aktivität des Halorhodopsins kann daher über die Anfangsgeschwindigkeit der passiven Protonenaufnahme bestimmt, d.h. anhand der pH-Änderung mit einer Glaselektrode gemessen werden (Abb. 3). Durch Titration mit Säure und Lauge läßt sich die Translokation der Protonen pro Zeiteinheit errechnen und ergibt damit die absolute Aktivität des Chloridtransportes. Bei diesem Test stört auch nicht die Anwesenheit der Protonenpumpe Bacteriorhodopsin, da diese durch Protonophore kurzgeschlossen wird.

Unter gleichen Bedingungen konnte umgekehrt die Bacteriorhodopsinaktivität unter Zugabe eines lipophilen Kations (TPP^+) anstelle des Protonophors ohne eine Störung durch Halorhodopsin gemessen werden. Damit können beide halobacteriellen Rhodopsine in einer beliebigen Mutante unabhängig voneinander bestimmt werden (Oesterhelt, 1982). Wie bereits erwähnt, zeigt das "Slow cycling Rhodopsin" keine Transportaktivität.

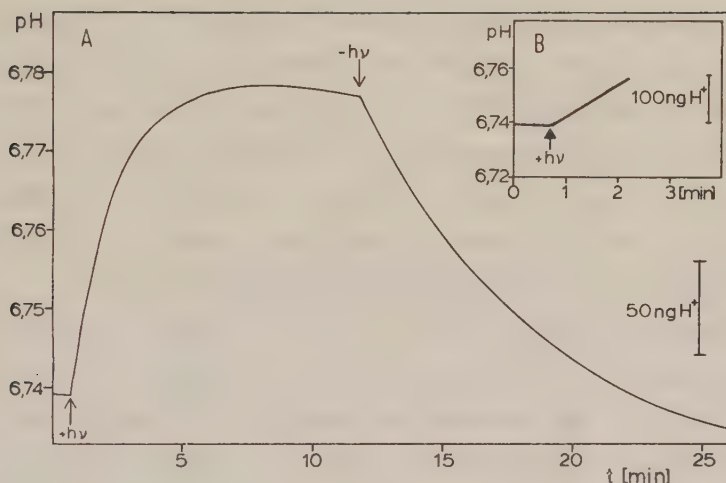


Abb. 3: Lichtinduzierte pH-Änderungen in Zellsuspensionen des *Halobacterium halobium* Stammes L-33 (20°C). Die Zellen wurden in 8 ml Basalsalzlösung/ 50 μ M CCCP suspendiert ($OD_{578} = 1,2$) und die pH-Änderung bei Belichtung (OG 515-Filter) gemessen (siehe Kap. 5.2.3.). In allen Experimenten wurde ein Ausgangs-pH-Wert von $6,8 \pm 0,1$ eingestellt. Die vertikalen Linien geben die Kalibrierung der gesamten pH-Änderung von L-33 Zellen (späte logarithmische Phase). $+h\nu$ = Licht an, $-h\nu$ = Licht aus. B: Anfangsgeschwindigkeit der Protonentranslokation unter gleichen Bedingungen.

3.1.3 Wachstumsoptimierung

Mit Hilfe des beschriebenen Testsystems wurde das Wachstum des Bacteriorhodopsin-freien Stammes L-33 bezüglich der Halorhodopsinsynthese optimiert. Es war bekannt, daß limitierte Belüftung von Halobakterienkulturen die Bacteriorhodopsinsynthese induziert, wobei nach 50 - 70 h

Wachstum im Stamm R1M1 ein maximaler Bacteriorhodopsingehalt erreicht wird (Oesterhelt und Stoeckenius, 1974). Ähnliche Bedingungen wurden auch für das Wachstum der L-33 Zellen gefunden. Auffallend bei allen Experimenten war, daß selbst unter Standardbedingungen die Reproduzierbarkeit von weiteren aber unbekannten Faktoren abhing. Um Störungen jeder Art auf ein Minimum zu reduzieren, wurde eine genaue Vorschrift zur Bereitung der Stammkulturen erarbeitet.

Für Routinekulturen standen drei 10 l NBS Fermenter zur Verfügung. Alle Variationen zur Wachstumsoptimierung wurden in einem 10 l NBS Magnaferm durchgeführt, der im Vergleich zu den anderen Fermentertypen immer die besten Resultate zeigte. Die optimalen Bedingungen dieses Testfermenters konnten aber nur bedingt auf die Routinezüchtungen übertragen werden, da die Geometrie der Rührwerke nicht aufeinander abgestimmt werden konnte und damit die unterschiedliche Luftdurchmischung das Wachstumsverhalten der Bakterienkultur veränderte.

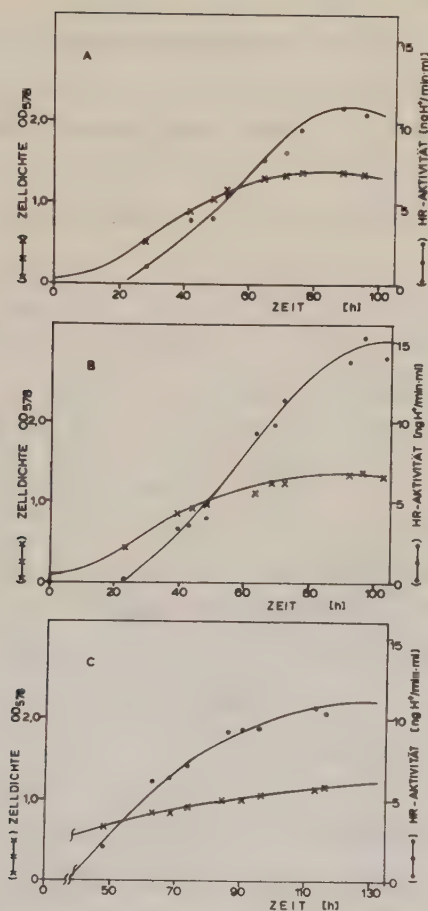


Abb. 4: Induktion der Synthese von Halorhodopsin in Zellen des Stammes L-33 unter verschiedenen Wachstumsbedingungen. Die Zelldichte wurde als Trübung bei 578 nm gemessen. Die Aktivität des Halorhodopsins wurde als Protonenaufnahme der Zellen bei Belichtung in Gegenwart des Protonophors CCCP bestimmt (siehe Aktivitätstest). **A:** Wachstumskurve von L-33 Zellen unter Rühren (300 rpm) und limitierter Belüftung (2 l/min) bei schwachem Raumlicht (NBS-Fermenter). **B:** Wachstumskurve unter gleichen Bedingungen wie in A, jedoch unter Belichtung (Osram Universal-Weiß 150 W). **C:** Wachstumskurve unter gleichen Bedingungen wie in B, aber mit einer langsameren Rührgeschwindigkeit (250 rpm).

Zur Wachstumsoptimierung wurden Proben in bestimmten Zeitabständen aus dem Fermenter entnommen, die Trübung (optische Dichte bei 578 nm) gemessen und die Halorhodopsinaktivität mit Hilfe des oben beschriebenen Tests bestimmt. Abb. 4A zeigt die Induktion der Halorhodopsinsynthese durch limitierte Belüftung während des Zellwachstums im Dunkeln. Analog zum Bacteriorhodopsin beginnt die Produktion des Chromoproteins erst in der späten logarithmischen Phase. Nach 90 h, zum Zeitpunkt der maximalen Halorhodopsinaktivität in der stationären Phase, wurde die Kultur geerntet. Zusätzliche Belichtung steigerte die Halorhodopsinausbeute um weitere 50 % und wurde deshalb als Standardmethode etabliert werden (Abb. 4B). Dagegen führte eine stärkere Limitierung der Luftzufuhr bzw. langsames Rühren zu einem verminderten Zellwachstum und damit nur zu mäßigen Halorhodopsinaktivitäten (Abb. 4C). Weitere Variationen wie z.B. die Zugabe von Spurenelementen (Mn-, Fe-Ionen) ergaben keine wesentlichen Verbesserungen.

Die für den Stamm L-33 optimierten Bedingungen wurden ebenfalls für Züchtungen der Mutante OD2 gewählt. Für eine maximale Halo-opsinsynthese in der retinalfreien Mutante L-07 wurden gleiche Vorbedingungen angenommen und daher die Zellen wie L-33, aber ohne Belichtung, gezüchtet.

3.2 Isolierung des Halorhodopsins

3.2.1 Membranfraktionierung

Chromophortest

Ein Aktivitätstest des Halorhodopsins, mit dem die Anreicherung des Chromoproteins während der einzelnen Reinigungsschritte verfolgt werden konnte (wie z.B. bei Enzymisolierungen), war wie für alle Transportsysteme nach Auflösen der Trägermembran nicht möglich. Eine Methode der Rekonstitution des Halorhodopsins in Liposomen steht für einen Routinetest bislang nicht zur Verfügung.

Daher wurde der Halorhodopsingehalt während der Reinigung über die Chromophorabsorption bei 580 nm spektrophotometrisch bestimmt. Eine direkte Messung des Chromoproteingehalts von Zellmembranen erwies sich jedoch wegen des hohen Cytochromanteils als zu ungenau. Es wurde deshalb eine Bestimmungsmethode ausgearbeitet, die auf einer spezifischen Reaktion retinalbindender Proteine mit Hydroxylamin unter Retinaloximbildung basiert. Das Differenzspektrum zweier identischer Proben vor und nach Belichtung ist in (Abb. 5) gezeigt und erlaubt die Berechnung des Chromophorgehalts aufgrund des bekannten Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_M = 50.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Diese Bestimmung erfasst in Zellmembranen des Stammes L-33 beide retinalbindenden Proteine Halorhodopsin und "Slow cycling Rhodopsin", die im Verhältnis von etwa 1 : 1 auftreten (Lanyi und Schobert, 1983; Steiner und

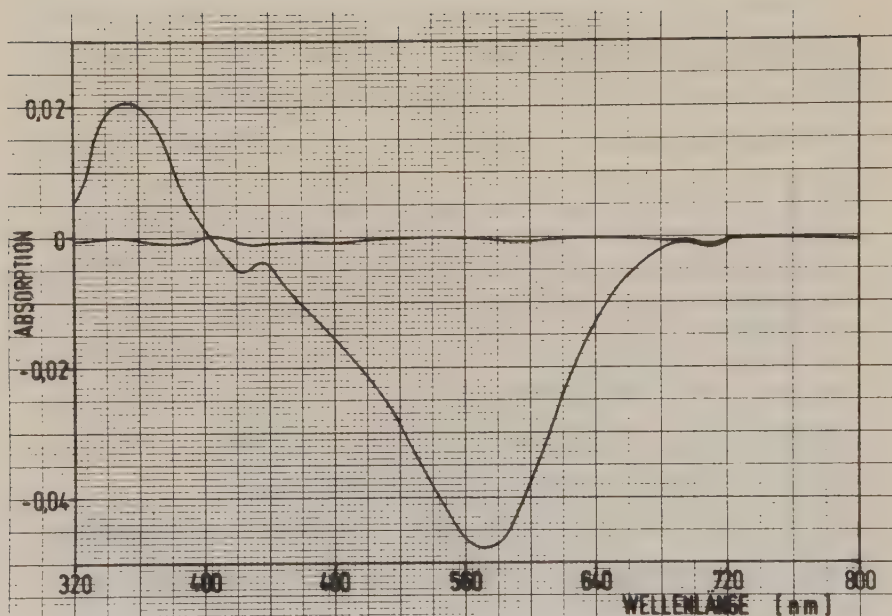


Abb. 5: Differenzspektrum einer Tween-gewaschenen Membran (0,36 mg/ ml) aus Zellen des Stammes L-33 nach 10 min Bleichung der beiden Chromoproteine Halorhodopsin und "Slow cycling Rhodopsin" in Gegenwart von Hydroxylamin (0,2 M, pH 7) und Licht (900 W, OG 515-Filter) bei 20°C. A: Basislinie beider Membranproben mit Hydroxylamin im Dunkeln. B: Differenzspektrum nach Bleichung von einer Probe im Licht.

Oesterheldt, 1983). Zur Berechnung des Halorhodopsingehalts in diesen Membranen wurde deshalb der Anteil des "Slow cycling Rhodopsin" von 50 % subtrahiert. Eine alternative Testmöglichkeit bot sich in der Aufnahme des Differenzspektrums nach Denaturierung der Chromoproteine mit dem

ionischen Detergenz SDS (Ogurusu et al., 1982), das aus der tieffarbigem Chromophorstruktur das gelbe Retinal freisetzt. Damit werden ähnliche Farbunterschiede wie in der Hydroxylaminreaktion erzeugt.

Während der Ausarbeitung des Chromophortests für Halorhodopsin wurde ein weiteres Hydroxylamin reaktives blaues Cu-bindendes Protein mit einer Absorption bei 590 nm entdeckt und teilweise charakterisiert (siehe Kap. 3.4.).

Isolierungsmethoden

Die lichtgetriebene Chloridpumpe Halorhodopsin kann wie viele Ionen-translozierende Katalysatoren als ein intrinsisches Membranprotein angesehen werden. Deshalb wurde aus einer Zellsuspension durch Dialyse gegen Wasser ein Lysat bereitet und aus ihm durch Zentrifugation der Chromoprotein-haltige Membrananteil in der Ultrazentrifuge sedimentiert (Gesamtmembranfraktion), d.h. das Halorhodopsin ist wie erwartet ein membrangebundenes Protein.

Eine alternative Methode zur Herstellung einer Gesamtmembranfraktion war die Bereitung von Vesikeln durch Beschallen der Zellen und anschließende Lyse. Wie die Analyse durch SDS-PAGE ergab, entfernte dieses Verfahren zwar mehr hochmolekulare Proteine als die direkte Lyse der Zellen, hatte aber gegenüber der direkten Bereitung der Gesamtmembranfraktion aus Zellen den Nachteil, daß mindestens 30 % des Membranmaterials verloren gingen.

Es ist bekannt, daß Bacteriorhodopsin in einer Subfraktion der Zellmembran vorkommt und als Purpurmembran durch isopyknische Zentrifugation auf einfache Weise gereinigt werden kann (Oesterhelt und Stoeckenius, 1971). Der Versuch die Zellmembran von Zellen des Stammes L-33 auf verschiedenen Rohrzuckergradienten zu subfraktionieren und Halorhodopsin in einer spezifischen Membranfraktion anzureichern schlug fehl.

Eine weitere Trennmethode von Zellmembranfragmenten besteht in einer 2 Phasentrennung nach Albertsson and Andersson (1981); in der eine Verteilung von Membranen mit unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften zwischen zwei nicht mischbaren wässrigen Phasen erfolgt. Deshalb wurde versucht, Bestandteile der Gesamtmembranfraktion nach Mischen mit detergentzhaltigen Dextran- und Polyäthylenglykolphasen durch Zentrifugation zu trennen. Wie die Analyse durch SDS-PAGE ergab, wurde das Membranmaterial jedoch in aggregierter Form ohne einen Anreicherungsseffekt aus der Interphase zurückgewonnen. Eine modifizierte temperaturabhängige 2 Phasentrennung mit dem nicht-ionischen Detergenz Triton X-114 ergab ebenfalls keine positiven Resultate (Bordier, 1981).

Tween-gewaschene Membran

Eine direkte Extraktion bzw. Solubilisierung der Gesamtmembranfraktion mit Detergenzien unter Farberhaltung des Chromophors wurde als nächstes versucht. Zur Verfügung standen handelsübliche Detergenzien unterschiedlichster

Strukturen und Eigenschaften (vergleiche unten). Durch die Anwendung des sehr hydrophilen Detergenz Tween 20 konnten viele der an die Membran assoziierten Proteine in Lösung gebracht werden, ohne die Membranstruktur aufzulösen (Hjerten und Johansson, 1972). Analysen durch den spektrophotometrischen Test und SDS-PAGE ergaben eine deutliche Anreicherung des nativen Halorhodopsins in dieser Membranfraktion. Bei einem Detergenz : Protein Verhältnis von 20 : 1 wurden 56 % der Fremdproteine entfernt (Tabelle II), die meisten mit einem scheinbaren Molekulargewicht von >50.000 Dalton (siehe auch Abb. 9). Unter anderem löste sich das blaue Cu-bindende Protein in die Tween 20 Phase des Überstands. Die rotviolette Tween-gewaschene Membran erwies sich in seinen Eigenschaften als sehr ähnlich zur Purpurmembran.

3.2.2 Chromatographische Anreicherung

Solubilisierung der Membran

Der kritische Schritt zur Isolierung des nativen Halorhodopsins war die Auflösung der Membranstruktur in stärkeren Detergenzien. Es wurden ca. 30 verschiedene Detergenzien auf ihre Eignung untersucht: anionische, kationische, zwitterionische und nicht-ionische Detergenzien (Übersichtsartikel: Tanford und Reynolds, 1976; Helenius und Simons, 1975; Hjelmeland und Chrambach, 1981). Mit folgenden Kriterien wurden viele Detergenztypen ausgeschlossen: a)

störende UV-Absorption in Pufferlösungen (Triton X-100 und viele ähnliche nicht-ionische Detergenzien), b) zu geringe Löslichkeit des Detergenz in einem breiten pH-Bereich, die nicht zur Auflösung der Membran führte (Natriumcholat, Natriumdesoxycholat) c) Denaturierung des Proteins und damit Entfärbung des Chromophors unter Bedingungen der Auflösung der Membran (Natriumdodecylsulfat, Cetyltrimethylammoniumbromid, ZwittergentTM 3-12 sowie weitere 20). Dagegen wurden einige wenige milde Detergenzien gefunden, die unter Farberhaltung die Membran, wenn auch nur in Gegenwart von mindestens 2 M Natriumchlorid, auflösten. Für größere Ansätze erwies sich aus wirtschaftlichen Gründen das nicht-ionische Detergenz Lubrol PX geeigneter als das sehr teure Octylglucosid. Letzteres stabilisierte jedoch die native Struktur des Chromoproteins wesentlich besser und wurde daher nach dem letzten Reinigungsschritt gegen Lubrol PX eingetauscht. Die Einflüsse von Temperatur und Solubilisierungsdauer auf die Farberhaltung des Chromoproteins konnten nicht vernachlässigt werden: 30 min Rühren bei Raumtemperatur löste die Membran unter optimalen Bedingungen auf. Neuere Experimente zeigten, daß mit einem weiteren milden, aber billigeren Detergentyp, dem Decansäure-N-methylglucamid (Hildreth, 1982), die native Struktur des Chromoproteins gut erhalten bleibt. Damit kann zukünftig die gesamte Anreicherung des Halorhodopsins in einem einzigen Detergenz ohne einen anschließenden Detergenzwechsel durchgeführt werden.

Selbst unter optimalen Bedingungen in 1 % Octylglucosid oder

1 % Lubrol PX in 4 M Natriumchlorid blieben nur 50 % der violetten Farbe nach Solubilisierung erhalten (Tabelle II). Da L-33 Zellen die beiden retinalbindenden Proteine Halorhodopsin und "Slow cycling Rhodopsin" enthalten, konnte der Verlust an violetter Farbe entweder eine teilweise Entfärbung beider Chromoproteine oder eine selektive Entfärbung von nur einem bedeuten. Durch folgende Ergebnisse läßt sich der Farbverlust als die selektive Denaturierung des "Slow cycling Rhodopsin" nachweisen: a) Es wurde eine Tween-gewaschene Membran von Flx3 Zellen, die nur das "Slow cycling Rhodopsin", aber kein Bacteriorhodopsin und Halorhodopsin enthält, bereitet. Während der Auflösung verlor sie ihren violetten Farbanteil vollständig. b) Unter den gewählten Solubilisierungsbedingungen wurde die photochemische Aktivität des "Slow cycling Rhodopsin" zerstört (Bogomolni and Spudich, 1982). c) Der 50 %ige Farbverlust stand im Einklang mit den Untersuchungen der Photozyklen in L-33 Zellvesikeln (Lanyi und Schobert, 1983; Tittor, unveröffentlichte Ergebnisse). Aus den Halbwertszeiten der Rückbildungsreaktionen beider Pigmente ergab die Auswertung der blitzinduzierten Absorptionsänderungen ein Halorhodopsin zu "Slow cycling Rhodopsin" Verhältnis von ca. 1 : 1.

Phenyl-Sepharosechromatographie

Nach Auflösung der Tween-gewaschenen Membran trat während der folgenden chromatographischen Anreicherung bei Raumtemperatur und Tageslicht kein wesentlicher Farbverlust

des Halorhodopsinchromophors auf. Hydrophobe Chromatographie (Hjerten, 1978) über eine Phenyl-Sepharosesäule trennte das Halorhodopsin von der Hauptmenge der begleitenden Fremdproteine ab. Das Chromoprotein eluierte in zwei Fraktionen A und B, wogegen besonders die spektroskopisch störenden Anteile wie Cytochrome und Bacterioruberin (im Stamm OD2) vom Säulenmaterial adsorbiert wurden (Abb.6). Nach diesem Reinigungsschritt konnte der Chromoproteingehalt direkt spektroskopisch bestimmt werden (siehe Abb. 11, Tabelle II). Die Aufspaltung der Halorhodopsinfraktion in zwei Gipfel erwies sich als chromatographischer Artefakt, da das Material beider Gipfel nach der Aufarbeitung auf SDS-Gelen die gleichen Proteinbanden zeigte. Phenyl-Sephrosechromatographie bei 4°C im Dunkeln ergab nur eine Chromoproteinfraktion. Ein Kontrollversuch unter identischen Bedingungen mit einer Tween-gewaschenen Membran aus S9 Zellen ergab ebenfalls zwei Bacteriorhodopsin-haltige Fraktionen, obwohl dieses Protein als eine homogene Spezies bekannt ist.

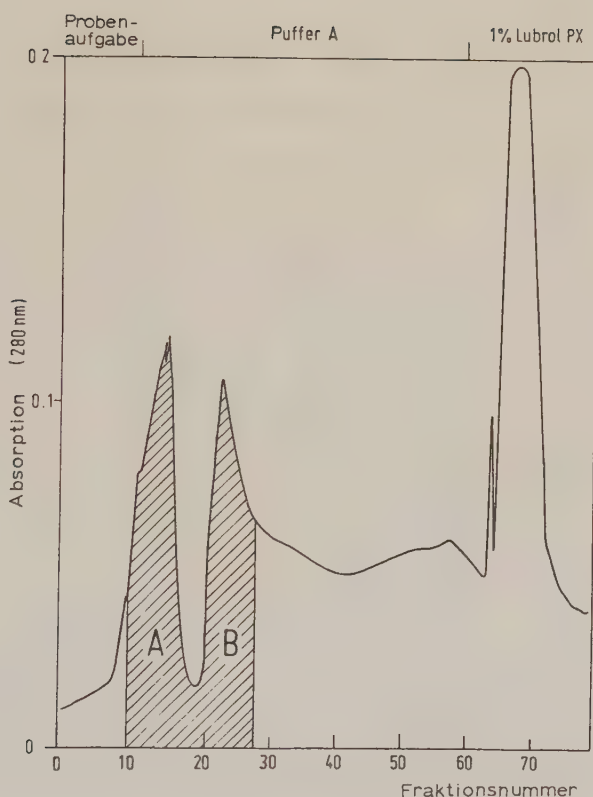


Abb. 6: Hydrophobe Chromatographie von 150 mg Tween-gewaschener Membran; gelöst in 130 ml Puffer A; auf Phenyl-Sepharose CL-4B (5 cm x 5 cm). Das Halorhodopsin wurde nicht adsorbiert und eluierte in zwei Fraktionen A und B (schraffierte Zonen). Waschen mit 1 % Lubrol PX entfernte die anderen Membrankomponenten; besonders Cytochrome und Bacterioruberin (OD2); von der Säule. Probenauftragung, Waschen mit Puffer A und 1 % Lubrol PX sind in der Abbildung oben eingezeichnet.
 Puffer A: 1 % Lubrol PX, 4 M NaCl, 10 mM MOPS pH 7, 0,05 % NaN_3

Hydroxylapatitchromatographie

Das violette Eluat der Phenyl-Sepharosesäule enthielt immer noch Material mit einer breiten Absorptionsbande um 400 nm. Die anschließende Hydroxylapatitchromatographie (Norberg und Hofsten, 1970) adsorbierte das gelbe Material an die Säule, während das Chromoprotein mit dem Ausschlußvolumen eluierte (Abb. 7). Differenzspektroskopie von Dithionit-reduzierten und oxidierten Proben zeigte keine Cytochrome in dem gelben Material, das erst nach Zugabe von 100 mM Natriumphosphat eluierte. Als verantwortlich für die gelbe Farbe erwies sich in der chemischen Analyse das Retinal. Man konnte daher annehmen, daß denaturiertes "Slow cycling Rhodopsin" und/ oder Halorhodopsin die Ursache für diese Verunreinigung der Präparation waren. Diese Vermutung wurde bestätigt durch die Bereitung einer Tween-gewaschenen Membran aus Zellen des Stammes Flx3, die, wie schon beschrieben, ihre violette Farbe bei Auflösung verlor. Nach Phenyl-Sepharosechromatographie eluierte in diesem Fall nur das um 400 nm absorbierende Material in zwei Fraktionen, die den zwei Gipfeln der Halorhodopsinanreicherung entsprachen.

Detergenzaustausch

Der letzte Teil der Halorhodopsinisolierung bestand in einem Austausch des Detergenz Lubrol PX gegen Octylglucosid auf einer zweiten Phenyl-Sepharosesäule (Abb. 8) und der anschließenden Konzentrierung in einer Amiconzelle mit einem hydrophilem YM 10 Filter.

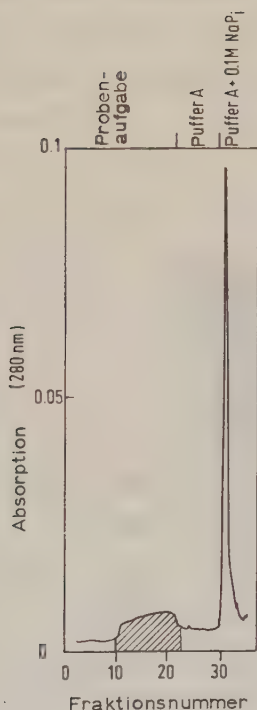


Abb. 7: Hydroxylapatitchromatographie (Bio-Gel HT, 1,6 cm x 2 cm) der vereinigten Fraktionen 10 - 20 (172 ml, 18 mg Protein) nach Phenyl-Sepharosechromatographie. Halorhodopsin wurde nicht retardiert und eluierte im Ausschlußvolumen (schrattierte Zone). Das adsorbierte gelbe Material wurde mit 100 mM Natriumphosphat/ Puffer A eluiert. Die einzelnen Arbeitsschritte sind in der Abbildung oben eingezeichnet.

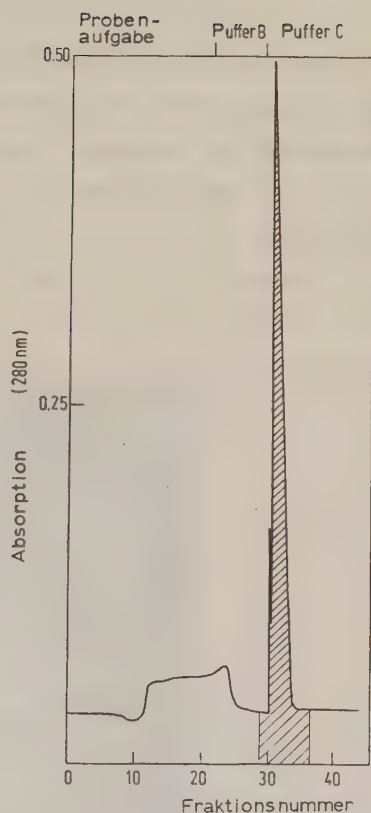


Abb. 8: Detergenzaustausch des Lubrol PX gegen Octylglucosid auf einer zweiten Phenyl-Sepharosesäule (2,6 cm x 10 cm), die im detergentfreien Puffer B äquilibriert war. Nach Auftragen der vereinigten Fraktionen 10 - 23 (179 ml, 8 mg Protein) der Hydroxylapatitchromatographie, wurde die Säule erst mit Puffer B gewaschen und Halorhodopsin mit Puffer C als scharfe Bande (schrattierte Zone) eluiert. Puffer B: 4 M NaCl, 10 mM MOPS pH 7, 0,05 % NaN_3 . Puffer C: 1 % Octylglucosid, 1 M NaCl, 10 mM MOPS pH 7, 0,05 % NaN_3 .

Das SDS-Polyacrylamidgel der Abbildung 9 zeigt den Reinigungseffekt jedes einzelnen Anreicherungs-schrittes und die Sauberkeit des Endprodukts. Abbildung 10 faßt die Einzelschritte zusammen, die mit 60 % Ausbeute zur 230 fachen Anreicherung des Halorhodopsins führten (Tabelle II).

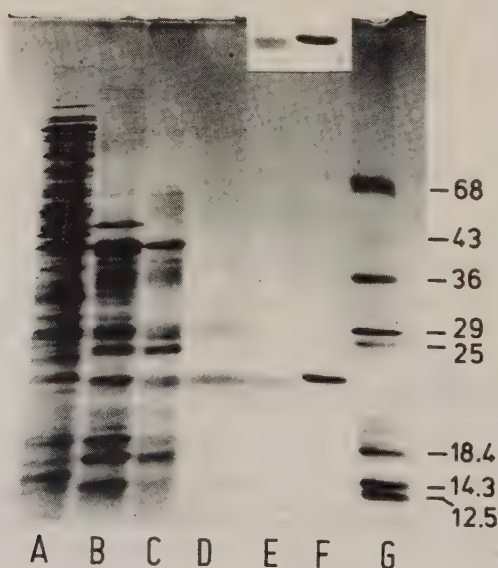


Abb. 9: Analytische SDS-PAGE der Halorhodopsinfraktionen aus verschiedenen Stufen der Anreicherung. Das SDS-Gel wurde mit 10 % Trichloressigsäure fixiert und mit Coomassie R 250 gefärbt. Es wurde zwischen 10 - 25 µg Protein eingesetzt. A: Lysat; B: Gesamtmembranfraktion; C: Tween-gewaschene Membran; D: vereinigte Fraktionen 10 - 28 nach Phenyl-Sepharosechromatographie; E: gereinigtes Halorhodopsin; F: Bacteriorhodopsin; G: Markerproteine (mit ihren Molekulargewichten). Im Ausschnitt (oben rechts) wird links die Doppelbande des Halorhodopsins und rechts Bacteriorhodopsin aus einem anderen SDS-Gel mit höherer Auflösung gezeigt.

Das nach dieser Vorschrift bereitete Halorhodopsin-Chromoprotein konnte für einige Wochen bei 4°C im Dunkeln gelagert werden. Alle weiteren Versuche zur Charakterisierung des nativen Halorhodopsins wurden, wenn nicht anders angegeben, mit diesem Chromoprotein in 1 % Octylglucosid bei hoher Ionenstärke (>1 M NaCl) durchgeführt. Als Referenzproben für viele Experimente dienten Bacteriorhodopsinlösungen, die unter gleichen Bedingungen durch Solubilisierung der Purpurmembran in 1 % Octylglucosid bei hoher Ionenstärke (>1 M NaCl) bereitet wurden.

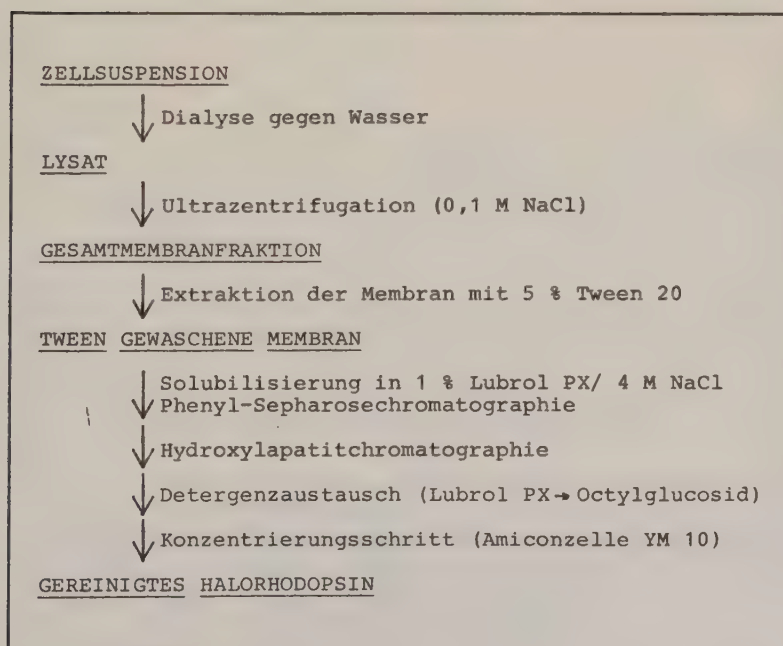


Abb. 10: Anreicherungsschema des Halorhodopsins

Tabelle II: ANREICHERUNG DES NATIVEN HALORHODOPSINS

Anreicherungs- schritt	Volumen (ml)	Protein (mg)	Pigment (nMol) $\text{NH}_2\text{OH}+\text{hv}$ abs.	spezif. Pigment- gehalt (nMol/mg)	Anreicherungs- faktor	Ausbeute %
Lysat	400	3810	660	0,17	1	100
Gesamtmembran- fraktion	61	436	628	1,4	8	95
Tween-gewaschene Membran	13,7	193	518	2,7	16	78
Phenyl-Sepharose- chromatographie	172	18	253	14	82	39
Hydroxylapatit- chromatographie	179	8	251	31	182	38
Detergenz- austausch	27	6	203	34	200	31
Konzentrierung (Amicon YM 10)	7,6	5	195	39	230	30

Die Angaben in der Tabelle beziehen sich auf die Anreicherung aus einer 40 l Zellkultur. Die Pigmentkonzentration wurde entweder durch Differenzspektroskopie nach Hydroxylaminbleichung ($\text{NH}_2\text{OH}+\text{hv}$) oder durch Aufnahme des Absolutspektrums (abs.) bestimmt. Der molare Extinktionskoeffizient von $50.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ wurde verwendet (siehe Kap. 3.3.1.).

3.3 Charakterisierung des Halorhodopsins

3.3.1 Allgemeine Charakterisierung

Absorptionsspektrum

Das Spektrum des Halorhodopsins zeigte ein Absorptionsmaximum bei 580 ± 2 nm (Abb. 11); das gegenüber dem Absorptionsmaximum von 588 nm in Zellvesikeln (Lanyi und Weber, 1980) blauverschoben ist. Für Bacteriorhodopsin wurde bei der Auflösung der Purpurmembran in Octylglucosid und Salz unter gleichen Bedingungen eine ähnliche Blauverschiebung um ca. 5 nm gemessen.

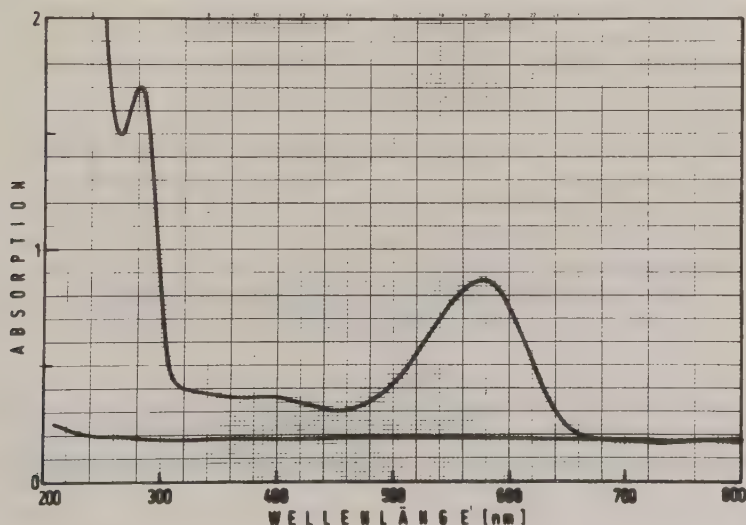


Abb. 11: Absorptionsspektrum des gereinigten Halorhodopsins (12,8 nMol/ ml) in 1 % Octylglucosid/ 1 M NaCl/ 10 mM MOPS pH 7/ 0,05 % NaN_3 .

Beide Chromoproteine zeigen eine Licht-Dunkel-Adaption: Belichtetes Bacteriorhodopsin in der Purpurmembran hat ein Absorptionsmaximum bei 570 nm (lichtadaptiert). Es enthält bevorzugt bzw. ausschließlich all-trans-Retinal. Beläßt man derartige Proben im Dunkeln, so entsteht im Verlauf von einigen Stunden die "dunkeladaptierte Form" ($\lambda_{\text{max}} = 560 \text{ nm}$), die ca. 50 % all-trans und 50 % 13-cis-Retinal enthält (Oesterhelt et al., 1973). Ähnliche Verhältnisse konnten ebenfalls in Halorhodopsinproben gezeigt werden: die lichtadaptierte Form absorbierte bei 579 nm und die dunkeladaptierte bei 575 nm mit einer Halbwertszeit des Übergangs von 36 h. Isolierung der Retinalisomere und Auftrennung durch HPLC ergab jedoch für beide Formen ein gleiches all-trans : 13-cis Verhältnis von 3 : 1 (Hegemann, 1984); d.h. der Halorhodopsinchromophor existiert in zwei verschiedenen Formen, die jedoch nichts mit der cis-trans Isomerie zu tun haben (Oesterhelt et al., 1973).

Der Extinktionskoeffizient des Halorhodopsinchromophors wurde mit Bacteriorhodopsin als Referenz ($\epsilon_M = 63.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) nach folgender Methode bestimmt. Die retinalbindenden Proteine aus Halobakterien werden, wie schon in Kap. 3.2.1. beschrieben, mit Hydroxylamin im Licht unter Bildung von Retinaloxim gebleicht. Aufgrund dieser Reaktion konnte in beiden Chromoproteinproben die Abnahme der Chromophorabsorption mit der Zunahme der Absorption des Retinaloxims bei 360 nm korreliert werden (Abb. 12). Daraus ließ sich der Extinktionskoeffizient des Halorhodopsins unter der Annahme berechnen, daß die in beiden Proben

gebildeten Retinaloxime ein ähnliches Isomerenverhältnis von cis-trans bzw. syn-anti Formen hatten (Oesterheld et al., 1973; Hegemann, 1984). Für das Halorhodopsin wurde so eine molare Extinktion von $50.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ erhalten, die der aus Messungen für das Chromoprotein in Zellvesikeln sehr nahe kommt (Lanyi und Weber, 1980).

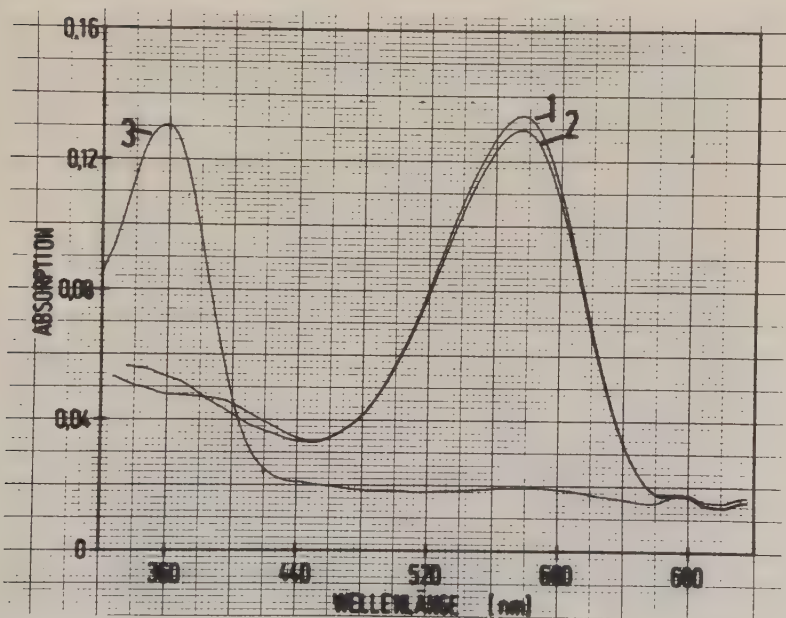


Abb. 12: Bleichung des Halorhodopsins ($2,3 \text{ nMol/ml}$) mit Hydroxylamin ($0,2 \text{ M}$, $\text{pH } 7$) im Licht (900 W , OG 515-Filter). 1: Halorhodopsin vor Bleichung; 2: nach Zugabe von Hydroxylamin im Dunkeln; 3: nach 15 min Belichtung (vollständige Bleichung).

Die Absorptionsbande des Halorhodopsins hatte die gleiche Halbwertsbreite von 124 nm wie Bacteriorhodopsin. In flüssigen Stickstoff bekam die Absorptionsbande mit einer schmalen Halbwertsbreite von 86 nm eine asymmetrische Form mit zwei Schultern um 548 nm und 600 nm (Abb. 13).

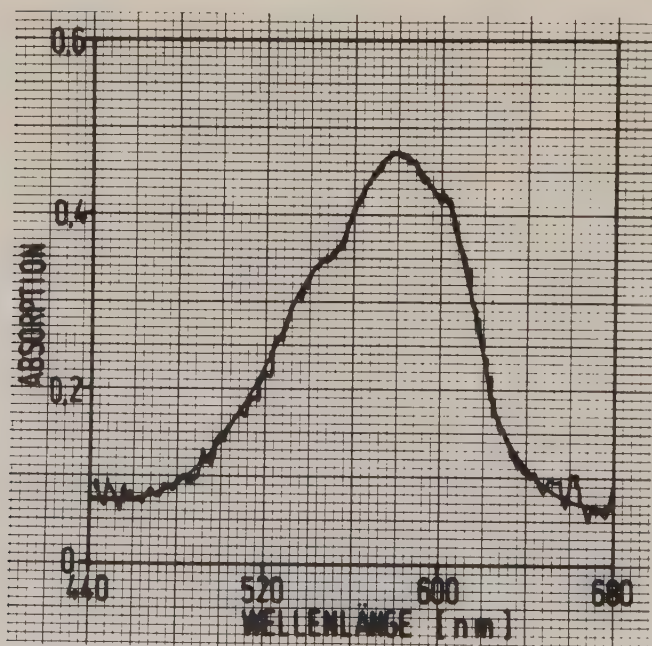


Abb. 13: Absorptionsspektrum des Halorhodopsins (7,4 nMol/ml) bei 78 K nach langsamen Einfrieren der Probe in flüssigen Stickstoff (im gleichen Puffer wie in Abb. 11).

Eine schwache Absorptionsbande, der sogenannte β -Peak, wird wie in den Spektren des Bacteriorhodopsins oder der Sehpigmente auch im Spektrum des Halorhodopsins beobachtet (Abb. 11). Sie weist nicht auf Spuren von entfärbten Chromoprotein hin, sondern wird auf eine Absorption der nativen Chromophorstruktur zurückgeführt. Halorhodopsin zeigt ein ähnliches Absorptionsverhältnis bei 580 nm/280 nm von 1 : 1,85 wie Bacteriorhodopsin (1 : 1,7).

Aus der Aminosäureanalyse einer Halorhodopsinprobe bekannter Konzentration (bestimmt über die optische Dichte bei 580 nm) wurde eine Stöchiometrie von 1 Retinalmolekül pro Halo-opsinmolekül bestimmt (Hegemann, 1984).

Stabilität

Isoliertes Halorhodopsin konnte ohne Verlust der Absorption für einige Wochen bei 4°C im Dunkeln gelagert werden. Der Chromophor denaturierte aber langsam bei permanenter Belichtung. Als Produkt entstand gelbes Material mit einem Absorptionsmaximum bei 392 nm (Abb. 11), das weder thermisch noch photochemisch in das native Chromoprotein zurückzuführen war. In salzfreien Medium entfärbte sich Halorhodopsin schnell, blieb aber stabil bei Entfernen von Octylglucosid durch Dialyse in Gegenwart von Salz (>100 mM NaCl).

Molekulargewichtsbestimmung

Das Molekulargewicht eines Proteins kann durch die relativen elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeiten in SDS-Polyacrylamidgelen bestimmt werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit der SDS-beladenen Polypeptidkette wird mit den Geschwindigkeiten von Proteinen bekannten Molekulargewichtes verglichen (Weber und Osborn, 1969). Daraus ergab sich ein scheinbares Molekulargewicht des Halorhodopsins von 20.000 bzw. 19.000 Dalton in der Doppelbande (Abb. 14), d.h. ca. 1.000 bzw. 2.000 Dalton weniger als das scheinbare Molekulargewicht des Bacteriorhodopsins mit 21.000 Dalton, das jedoch ein wahres Molekulargewicht von 25.700 Dalton besitzt (Khorana et al., 1979). Bei dieser Bestimmungsmethode des Molekulargewichts ist zu beachten, daß die spezifische Beladung (g SDS/ g Protein) von verschiedenen Proteinen mit SDS wegen unterschiedlicher Hydrophobizität, Basizität und Polarität voneinander abweichen kann (Reynolds und Tanford, 1970). Unter der Annahme, daß Halorhodopsin auf SDS-Gelen wie Bacteriorhodopsin atypisch wandert, wurde ein wahres Molekulargewicht von 25.000 Dalton für das Halorhodopsin vorgeschlagen (Lanyi und Oesterhelt, 1982).

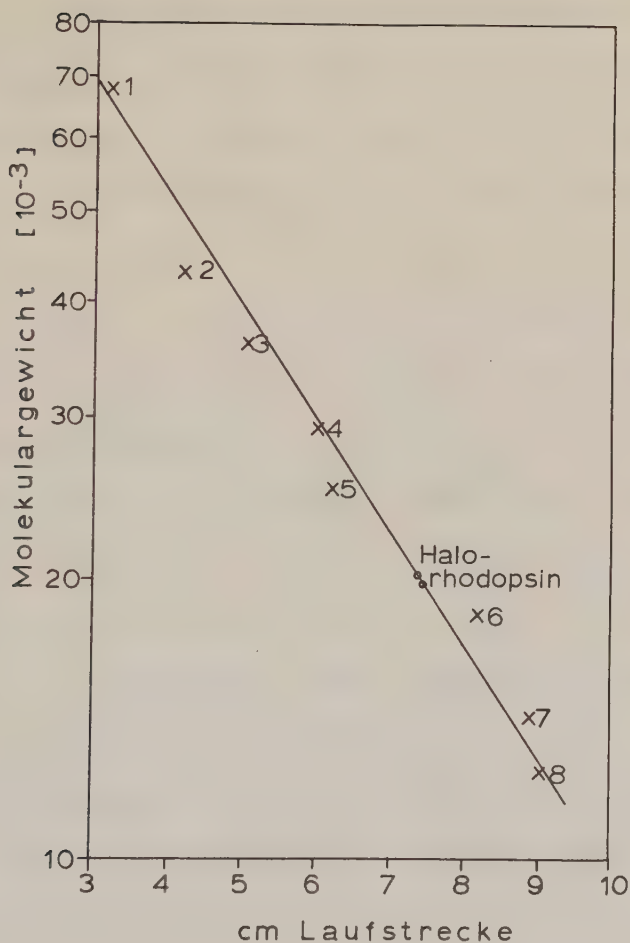


Abb. 14: Auswertung der SDS-PAGE mit Halorhodopsin und Eichproteinen. 1: Rinderserumalbumin (68.000) 2: Ovalbumin (43.000) 3: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (36.000) 4: Carboanhydrase (29.000) 5: Chymotrypsinogen A (25.000) 6: β -Lactoglobulin A (18.500) 7: Lysozym (14.200) 8: Cytochrom c (12.500). Der SDS-PAGE Molekulargewichtstandard wurde selbst zusammengestellt.

Natives Halorhodopsin wurde ebenfalls durch Gelfiltration in Detergenzlösung bei hoher Ionenstärke mit Bacteriorhodopsin verglichen. Beide Chromoproteine wurden unter identischen Bedingungen auf einer TSK-G 3.000 W Säule chromatographiert und eluierten nach 17,5 ml (BR) beziehungsweise nach 18,5 ml (HR) und nicht im Ausschlußvolumen (Abb. 15). Da natives monomeres Bacteriorhodopsin in 1 % Octylglucosid bei niedriger Ionenstärke (Dencher und Heyn, 1978) mit dem gleichen Volumen eluierte (H.Michel, unveröffentlichte Ergebnisse), wurde angenommen, daß Halorhodopsin unter diesen Bedingungen sich als Monomeres verhält (Steiner und Oesterheld, 1983). Neuere Ergebnisse mit CD-Spektroskopie stellten diese Annahme jedoch in Frage. CD-Spektren der Purpurmbran zeigen eine starke Excitonkopplung, die auf eine enge Wechselwirkung der Retinalchromophore in den trimeren Bacteriorhodopsinkomplexen zurückzuführen ist (Heyn et al., 1975; Becher und Ebrey, 1976). Solubilisierung der Purpurmbran mit verschiedenen Detergenzien bei niedriger Ionenstärke führt unter Aufhebung der Excitonkopplung zu einer Monomerisierung des Bacteriorhodopsins (Dencher und Heyn, 1978). Überraschenderweise ergab die Auflösung sowohl der Purpurmbran als auch der Tween-gewaschenen Membran in Detergenz bei hoher Ionenstärke (4 M NaCl) nicht die erwartete Aufhebung der Excitonkopplung (siehe Kap. 3.3.4.); d.h. beide Chromoproteine Bacteriorhodopsin und Halorhodopsin wurden unter diesen Bedingungen nicht monomerisiert. Dieses Ergebnis steht aber im Widerspruch zu den oben beschriebenen Gelfiltrationsexperimenten, in denen die

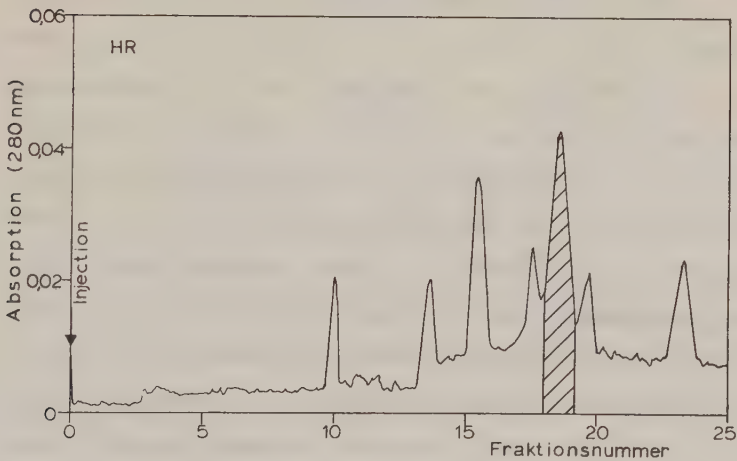
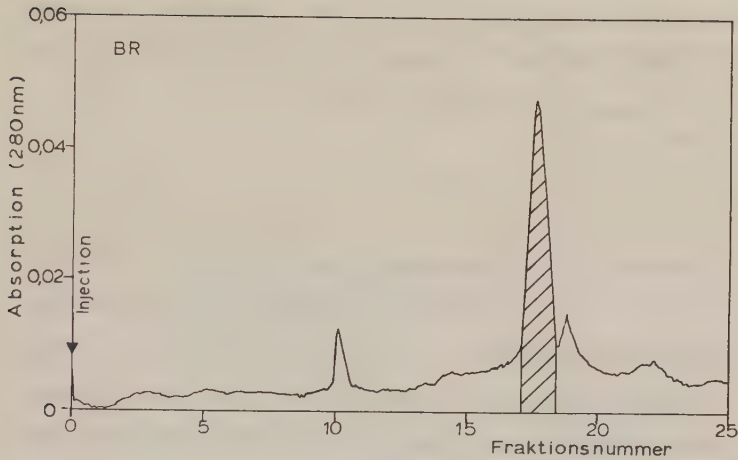


Abb. 15: Gelfiltration von nativen Bacteriorhodopsin (9,8 nMol) und Halorhodopsin (9,3 nMol, nach präparativer Phenyl-Sepharosechromatographie) auf einer TSK-G 3.000 W Säule (7,5 mm x 600 mm). Die Chromoproteinfractionen sind schraffiert gekennzeichnet. Laufpuffer: 1 % Octylglucosid, 4 M NaCl, 10 mM MOPS pH 7, 0,05 % NaN_3 ; Probenvolumen: 200 μl ; Flußrate: 6 ml/h; Fraktionsvolumen: 1 ml; Detektion: 280 nm.

Chromoproteine in Octylglucosid sowohl bei hoher als auch bei niedriger Ionenstärke etwa im gleichen Volumen eluierten. Erst weitere Untersuchungen können daher die hierdurch aufgeworfenen Fragen klären.

Reinheit der Präparation

Das gereinigte Chromoprotein wanderte als Doppelbande mit 19.000 und 20.000 Dalton in hochauflösenden SDS-Polyacrylamidgelen (Ausschnitt in Abb. 9). Zweidimensionale Polyacrylamidgel-Elektrophorese der Präparation zeigte keine zusätzlichen Proteine und ergab einen ähnlichen isoelektrischen Punkt für beide Banden. Aufgrund folgender Ergebnisse wird angenommen, daß beide Banden zum Halorhodopsin gehören. a) Das 580 : 280 Verhältnis im Spektrum des Chromoproteins müßte um den Faktor 2 kleiner sein, wenn nur eine der beiden Banden das Retinal enthielte, aber beide einen ähnlichen Tryptophangehalt (wie das Bacteriorhodopsin) besäßen. b) Eine externe Zugabe von Retinal zum Retinal-freien Stamm L-07 induziert die Halorhodopsinsynthese während des Zellwachstums, und führt zu einer Verstärkung beider Proteinbanden. c) Reduktion des Halorhodopsins mit Natriumborhydrid zeigte in der anschließenden SDS-PAGE zwei fluoreszierende Banden bei 19.000 und 20.000 Dalton; d.h. beide Banden sind Retinylproteine. d) Aminosäureanalyse, Bromcyanspaltung und (teilweise) Sequenzanalyse des gereinigten Materials läßt darauf schließen, daß beide Proteinbanden die gleiche Polypeptidkette besitzen (b, c und d: Hegemann, 1984).

Reduktion mit Natriumborhydrid

Das isolierte Halorhodopsin konnte mit Natriumborhydrid im Dunkeln zu einem fluoreszierenden Retinylprotein reduziert werden. Abb. 16 zeigt ein SDS-Gel, in dem das auf der Stufe der Tween-gewaschenen Membran reduzierte Chromoprotein aufgetragen wurde. Als Referenz wurde das Retinylprotein des Bacteriorhodopsins, bereitet durch Belichtung der Purpurmembran in Gegenwart von Natriumborhydrid (Schreckenbach et al., 1977), allein oder als Mischung mit der Tween-gewaschenen Membran, aufgetragen. Das Fluoreszenzmuster in Abb. 16 zeigt nur ein Retinylprotein in der Tween-gewaschenen Membran direkt unter dem Retinylprotein des Bacteriorhodopsins an der Stelle der Halorhodopsin-Doppelbande. Die schlechte Auflösung dieses SDS-Gels trennte die Halorhodopsin-Doppelbande nicht auf. In der Wiederholung des gleichen Experiments mit Tween-gewaschener Membran aus Halorhodopsin-freien Flx3 Zellen konnte keine fluoreszierende Bande nachgewiesen werden, d.h. "Slow cycling Rhodopsin" wurde unter diesen Bedingungen nicht mit Natriumborhydrid im Dunkeln zu einem Retinylprotein reduziert. Weitere Versuche von P. Hegemann (1984) ergaben, daß die Proteinbande des "Slow cycling Rhodopsin" in SDS-Gelen nicht bei 20.000 Dalton liegt.

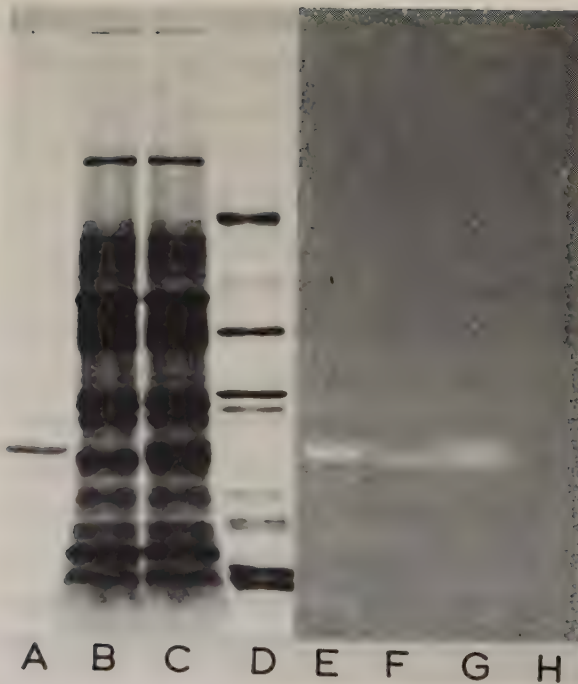


Abb. 16: Vergleich der beiden Retinylproteine des Halorhodopsins und des Bacteriorhodopsins durch analytische SDS-PAGE. Es wurde zwischen 5 - 40 μ g Protein eingesetzt. A - D: Coomassieanfärbung des Retinylproteins des Bacteriorhodopsins (A), mit Natriumborhydrid reduzierte Tween-gewaschene Membran aus L-33 Zellen (B), eine gleiche Mischung von A und B (C) und Markerproteine (D); E - H: Fluoreszenzmuster des gleichen SDS-Gels vor Anfärbung mit Coomassie R 250.

Aufgrund der Reduktion des Halorhodopsins zu einem fluoreszierenden Retinylprotein und der Bleichung mit Hydroxylamin im Licht zu Retinaloxim ist die Retinalbindungsstelle des Chromoproteins wahrscheinlich die Aminogruppe eines Lysinrestes (Abb. 17). Weitere Eigenschaften des Retinylproteins des Halorhodopsins werden in (Hegemann, 1984) beschrieben.

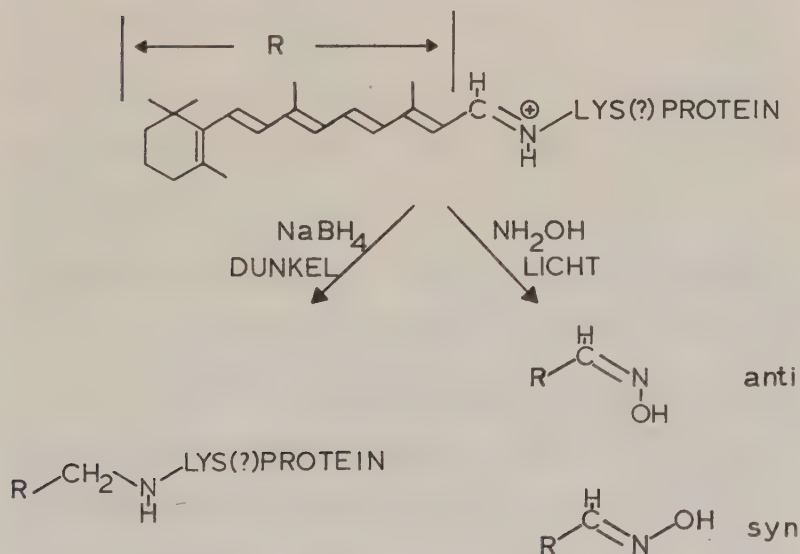


Abb. 17: Schematische Darstellung der hypothetischen Retinal-Protein-Bindung im Halorhodopsin sowie der Reaktionsprodukte nach Reduktion mit Natriumborhydrid im Dunkeln und Bleichung mit Hydroxylamin im Licht.

Photozyklus des Halorhodopsins

Die drei Chromoproteine Bacteriorhodopsin, Halorhodopsin und "Slow cycling Rhodopsin" aus Halobacterium halobium durchlaufen im Licht einen Photozyklus, an den die spezifische Funktion, im Falle von Bacteriorhodopsin die Protonentranslokation und im Falle von Halorhodopsin die Chloridtranslokation gekoppelt ist. Die photochemischen Eigenschaften dieser Pigmente können mit Blitzlichtspektroskopie untersucht werden. Bei den blitzinduzierten Absorptionsänderungen des Bacteriorhodopsins zeigt sich die wesentliche Komponente des Photozyklus bei 412 nm (Intermediat M). Bei 20°C liegt die Halbwertszeit der Rückbildung des Ausgangszustands (gemessen bei 570 nm) bei ca. 4 msec (Oesterhelt und Hess, 1973). Amplitude und Kinetik des Photozyklus von Bacteriorhodopsin sind stark pH-abhängig. Im Photozyklus des erst kürzlich entdeckten "Slow cycling Rhodopsin" wurde ein Intermediat bei 373 nm beobachtet, das mit einer längeren Halbwertszeit von 0,8 sec zerfällt (Bogomolni und Spudich, 1982).

Halorhodopsin durchläuft in Abhängigkeit der Chloridkonzentration zwei unterschiedliche Photozyklen mit verschiedenen Intermediaten. In Gegenwart von Chlorid (Chloridzyklus) wird P_{520} und in Abwesenheit von Chlorid (Wasserzyklus oder chloridfreier Zyklus) P_{660} gebildet (Bogomolni et al., 1981; Lanyi und Schobert, 1983).

Die Intermediate des Photozyklus von Halorhodopsin wurden daher durch die blitzinduzierten Absorptionsänderungen bei 570 nm (Ausbleichen und Rückbildung des HR), bei 500 nm

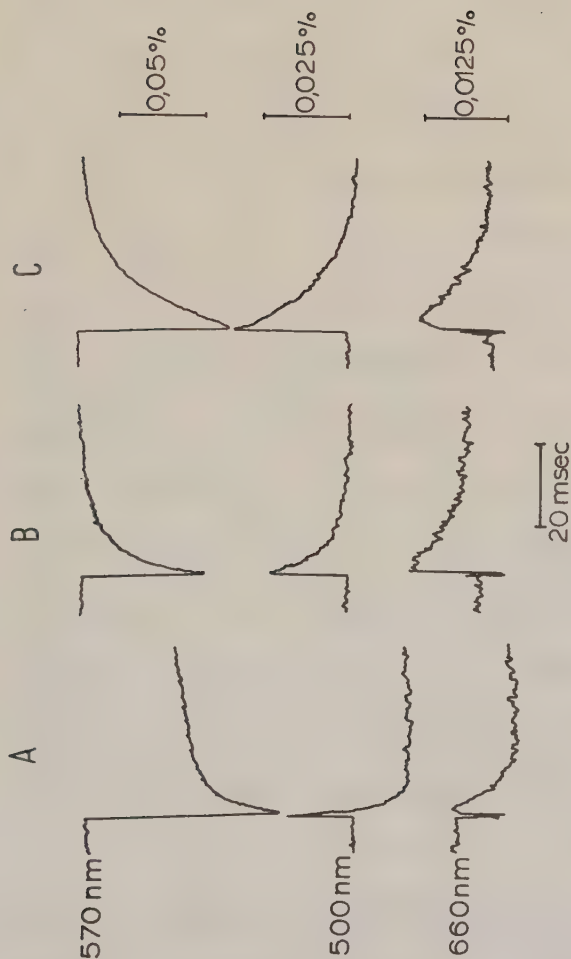


Abb. 18: Blitzinduzierte Absorptionsänderungen in Zellvesikeln aus *Halobacterium halobium* (A), in Zellvesikeln nach Zugabe von Octylglucosid (B) und im reinen Halorhodopsin (C). Puffer: 1 M NaCl, 10 mM MOPS pH 7 für (A); 1 M NaCl, 10 mM MOPS pH 7, 1 % Octylglucosid für (B) bzw. 0,1 % Octylglucosid für (C). Proteinkonzentration der Zellvesikel: 10 mg/ml; Konzentration des Chromoproteins: 2 nMol/ml, die ungefähr der Konzentration an Halorhodopsin in den Zellvesikeln entspricht. Die blitzinduzierten Absorptionsänderungen wurden bei den angegebenen Wellenlängen gemessen. Die senkrechten Linien geben die Absorptionsänderungen pro Blitz an; Blitzfrequenz: 4 Hz, Mittelung über 512 Blitze.

(Bildung und Zerfall des P_{520}) und bei 660 nm (Bildung und Zerfall des P_{660}) gemessen (Steiner et al., 1983). Die gleichzeitige Anwesenheit von Halorhodopsin und "Slow cycling Rhodopsin" in L-33 Zellvesikeln bedingt in 1 M Natriumchlorid eine biphasische Kinetik der blitzinduzierten Absorptionsänderungen: die schnelle Rückbildung des Halorhodopsins mit einer Halbwertszeit von 5 - 10 msec und die wesentlich langsamere Rückbildung des "Slow cycling Rhodopsin" im sec-Bereich (Bogomolni und Spudich, 1982; Tsuda et al., 1982; Lanyi und Schobert, 1983). Bei 570 nm addiert sich die blitzinduzierte Ausbleichung der Grundzustände, wogegen bei 500 nm und 660 nm sich komplexe Absorptionsänderungen durch Überlagerung ergaben (Abb. 18A). Die Auflösung der L-33 Zellvesikel in Octylglucosid führte zur bereits beschriebenen selektiven Entfärbung der langsamen Komponente "Slow cycling Rhodopsin" (siehe Kap. 3.2.2.). Daher wurden nur noch die blitzinduzierten Absorptionsänderungen des Halorhodopsins beobachtet (Abb. 18B). Übereinstimmend mit diesem Ergebnis wurden für das isolierte Halorhodopsin (in 1 M NaCl) die gleichen Absorptionsänderungen gemessen (Abb. 18C). Bei gleichen Konzentrationen an Halorhodopsin zeigte das reine Chromoprotein höhere Absorptionsänderungen, da die Lichtdurchlässigkeit der Halorhodopsinproben (Abb. 18C) größer ist als die der Detergenz-behandelten Zellvesikelfraktion (Abb. 18B) und damit eine stärkere Anregung bei gleicher Blitzintensität zuließ. Die Rückbildung des Halorhodopsins bei 570 nm ($t_{1/2} = 8,2$ msec) bzw. der Zerfall

der Intermediate P_{520} ($t_{1/2} = 6,0$ msec) und P_{660} ($t_{1/2} = 9,4$ msec) erfolgten zu über 92 Prozent mit einer Reaktion 1. Ordnung (Abb. 19).

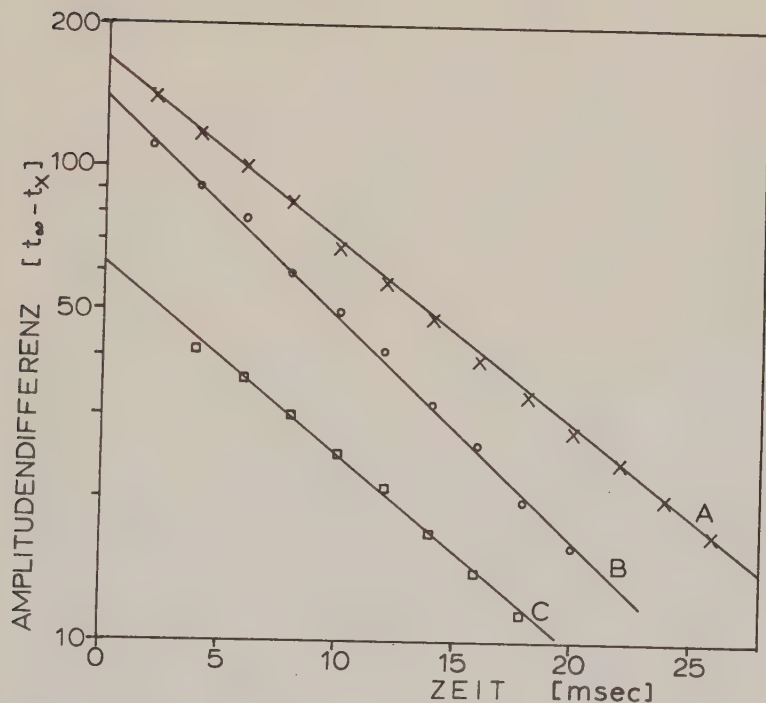


Abb. 19: Halblogarithmische Auftragung der blitzinduzierten Absorptionsänderungen des Halorhodopsins (2 nMol/ ml) gemessen bei 570 nm (A), 500 nm (B) und 660 nm (C).

Chloridabhängigkeit des Photozyklus

Halorhodopsin durchläuft wie oben beschrieben in Abhängigkeit der Chloridkonzentration zwei Photozyklen. Dies deutet auf eine Bindung von Chlorid an das Proteinmolekül unter Änderung seiner photochemischen Eigenschaften hin. Die Affinität für Chlorid wurde unter den gleichen Bedingungen der Blitzlichtphotolyse durchgeführt. Ein chloridfreies Medium mit hoher Ionenstärke zur Stabilisierung der Halorhodopsinstruktur wurde durch Dialyse der Proben gegen 0,5 M Natriumsulfat (bzw. Kaliumphosphat) erhalten. Hier zeigte Halorhodopsin nur ein geringes Ausbleichen der 570 nm Bande (Abb. 20A) mit einer schnellen Rückbildungszeit ($t_{1/2} < 5$ msec). Das Intermediat P_{660} , nicht jedoch das Intermediat P_{520} wurde beobachtet (Spuren bei 660 nm und 500 nm, Abb. 20A). Zugabe von 200 mM Chlorid bewirkte drastische Veränderungen des photochemischen Verhaltens von Halorhodopsin (Abb. 20B). Das Chromoprotein zeigte jetzt ein stärkeres Ausbleichen mit einer verlangsamten Rückbildungszeit. Gleichzeitig ließen sich beide Intermediate P_{520} und P_{660} beobachten. Eine weitere Erhöhung der Chloridkonzentration (> 1 M NaCl) brachte das Intermediat P_{660} zum Verschwinden. Mit diesen chloridabhängigen photochemischen Reaktionen zeigte das isolierte Chromoprotein die gleichen Eigenschaften wie Halorhodopsin in Zellvesikeln (Lanyi und Schobert, 1983). Die Chloridabhängigkeit der P_{520} -Bildung wird bei der Beschreibung der Anionenbindungsstellen des Halorhodopsins erwähnt (Kap. 3.2.3.).

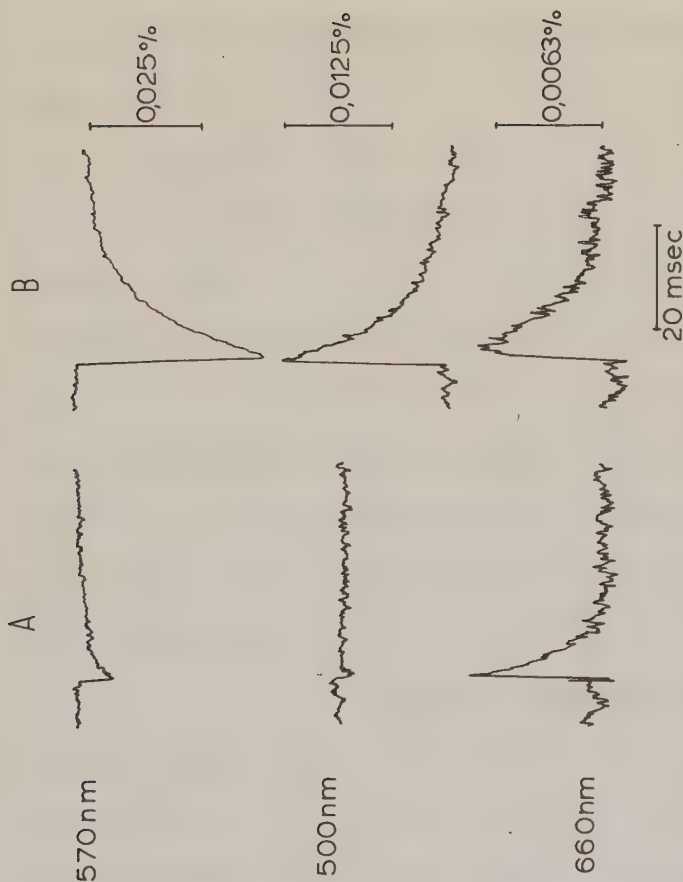


Abb. 20: Blitzinduzierte Absorptionsänderungen des Halorhodopsins (2 nmol/ml) in Abwesenheit (A) und in Gegenwart (B) von Chlorid. Das Chromoprotein, in 1 M NaCl, 10 mM MOPS pH 7 wurde gegen 0,5 M Na_2SO_4 , 10 mM MOPS pH 7 dialysiert. Chloridfreie Proben wurden nur einmal verwendet, da sie durch wiederholte Blitzanregung irreversibel gebleicht wurden. Dagegen waren Proben nach Zugabe von Chlorid (200 mM) stabil und wurden mehrmals benutzt.

Eine besondere Schwierigkeit in diesen Experimenten war die Photolabilität des chloridfreien Chromoproteins, die eine quantitative Auswertung der Ergebnisse unmöglich machte. So ist zum Beispiel die blitzinduzierte Absorptionsänderung bei 660 nm in Gegenwart von Chlorid (Abb. 20B) kleiner als in Abwesenheit von Chlorid (Abb. 20A). Diese Photolabilität ist auch ersichtlich aus den blitzinduzierten Absorptionsänderungen bei 570 nm (Abb. 20A und B). Abgesehen von der Photolabilität des chloridfreien Halorhodopsins sind wahrscheinlich noch folgende Effekte zu berücksichtigen: die geringere Absorption des aktinischen Lichts durch den ohne Chlorid nach 410 nm blauverschobenen Halorhodopsinchromophor (siehe Kap. 3.3.2.) und die geringere Quantenausbeute in Abwesenheit von Chlorid.

Zur Kontrolle der beobachteten Chloridabhängigkeit wurden die blitzinduzierten Absorptionsänderungen von Purpurmembransuspensionen und Bacteriorhodopsinlösungen bei 570 nm unter den gleichen Bedingungen untersucht. Chlorid hatte keinen Einfluß auf die Amplituden des Ausbleichens und der Rückbildung von Bacteriorhodopsin.

In reinen Halorhodopsinproben (in 1 % Octylglucosid/ 1 M NaCl/ 10 mM MOPS pH 7/ 0,05 % Azid) wurde bei Belichtung neben dem Intermediat P_{520} die Bildung eines langlebigen Photoprodukts beobachtet, das bei 410 nm absorbiert. Eine Untersuchung dieses sogenannten "410 nm Chromophors" wird im folgenden Kapitel beschrieben.

3.3.2 Untersuchungen zum 410 nm Chromophor

Bildung des ${}^{\text{L}}\text{HR}_{410}$

In intakten Zellen zeigen Halorhodopsin und Bacteriorhodopsin verschiedene Absorptionsmaxima (HR: 588 nm; BR: 570 nm). Dagegen absorbiert im isolierten Zustand Halorhodopsin bei 580 nm (HR_{580}) und Bacteriorhodopsin bei 565 nm. Beide Chromoproteine haben Photozyklen mit einer annähernd gleichen Frequenz (ca. 100 sec^{-1}); bilden jedoch unterschiedliche Intermediate (Kap. 3.3.1.). Beim Photozyklus des Bacteriorhodopsins läßt sich die thermisch kontrollierte Zerfallsreaktion des langlebigsten Intermediats M künstlich stark verlangsamen: im sogenannten Basalsalz-Äther-System erfolgt bei 20°C nach Bleichung des Chromoproteins die Rückbildung des Ausgangszustands mit einer Halbwertszeit von 13 sec (Oesterhelt und Hess, 1973). Diese photochemische Reaktion ist von einer Protonenabgabe bzw. -aufnahme begleitet.

Überraschenderweise erzeugte die Belichtung von Halorhodopsin (in 1 % Octylglucosid; 1 M NaCl, 10 mM MOPS pH 7, 0,05 % NaN_3) bei 5°C ebenfalls ein bei 410 nm absorbierendes Photoprodukt (${}^{\text{L}}\text{HR}_{410}$); das jedoch bisher nicht als Intermediat des Photozyklus beschrieben ist (Abb. 21). Der langsame Zerfall dieser Spezies unter Rückbildung des HR_{580} erfolgte in einer Reaktion 1. Ordnung mit einer Halbwertszeit von 54 sec bei 5°C . Unter gleichen Bedingungen wurde das Bacteriorhodopsin (in Puffer C) nach Belichtung mit

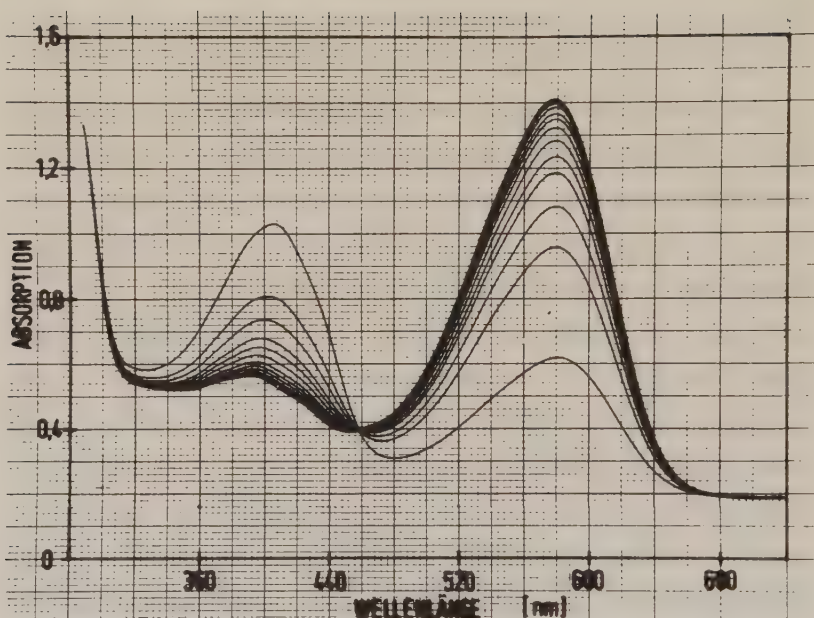
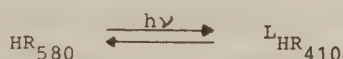


Abb. 21: Photoreaktion des Halorhodopsins (24 nMol/ml) in 1 % Octylglucosid, 4 M NaCl, 10 mM MOPS pH 7, 0,05 % NaN_3 bei 5°C. Die Proben wurden 1 min belichtet (OG 515-Filter). Das erste Spektrum hat die höchste Absorption bei 410 nm und die niedrigste bei 580 nm. Nach Abschalten des Lichtes wurden die Spektren der Rückbildung des HR_{580} in etwa 1 minütigen Abständen aufgezeichnet. Die Halbwertszeit der Reaktion wurde in einem separaten Experiment bestimmt.

einer Geschwindigkeit zurückgebildet, die unter der Zeitauflösung des Spektrophotometers (max. 300 msec) lag, d.h. in Bacteriorhodopsin wird unter diesen Bedingungen der Photozyklus nicht signifikant verlangsamt. Halorhodopsin durchlief ebenfalls neben der langsamen Reaktion zum $\text{L}_{\text{HR}_{410}}$

seinen Photozyklus im 10 msec Bereich. Damit läßt sich die $L_{HR_{410}}$ -Bildung mit der Reaktion



beschreiben. Die Absorptionsbanden beider Formen haben einen isosbestischen Punkt bei 460 nm. Blaublicht beschleunigte zu etwa 90 % die Rückbildung des HR_{580} (Abb. 22), wogegen die letzten 10 % unabhängig waren. Eine derartige Blaubeschleunigung der Rückbildungsreaktion wurde ebenfalls im Bacteriorhodopsin beobachtet und ausführlich untersucht (Oesterhelt et al., 1975; Hess und Kuschmitz, 1977; Danczhazy et al., 1978).

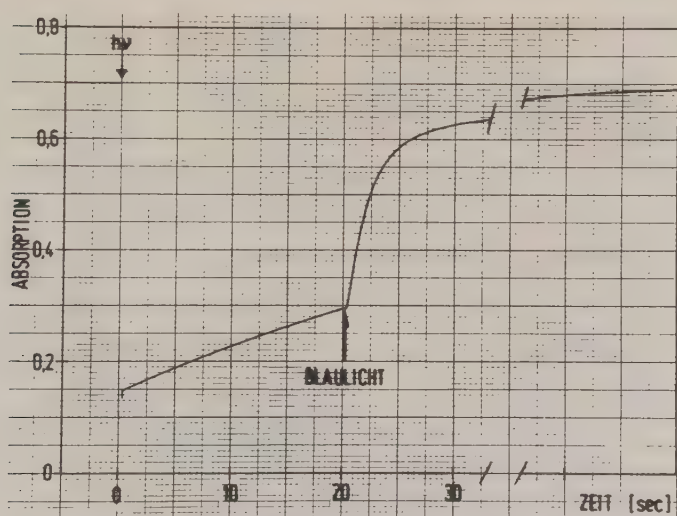


Abb. 22: Blaublichtbeschleunigung (390 - 415 nm Interferenzfilter) der Regenerierung des HR_{580} .

Die Bildung des L_{HR410} war weiterhin von einer reversiblen Protonenabgabe begleitet. Abb. 23 zeigt die lichtinduzierte pH-Änderung mit einer berechneten Stöchiometrie von 1 - 2 Protonen pro Chromophor. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf eine Deprotonierungs-Protonierungsreaktion der Schiff'schen Base im Halorhodopsin mit der damit verbundenen Blauverschiebung des Chromophors zurückzuführen. Im Bacteriorhodopsin ist die Protonenabspaltung unter Ausbildung des Intermediats M mit dem Transport von Protonen gekoppelt. Dagegen ist zwischen der beschriebenen Deprotonierungsreaktion im Halorhodopsin und der Funktion des Halorhodopsins als Chloridpumpe bis jetzt noch kein Zusammenhang zu erkennen.

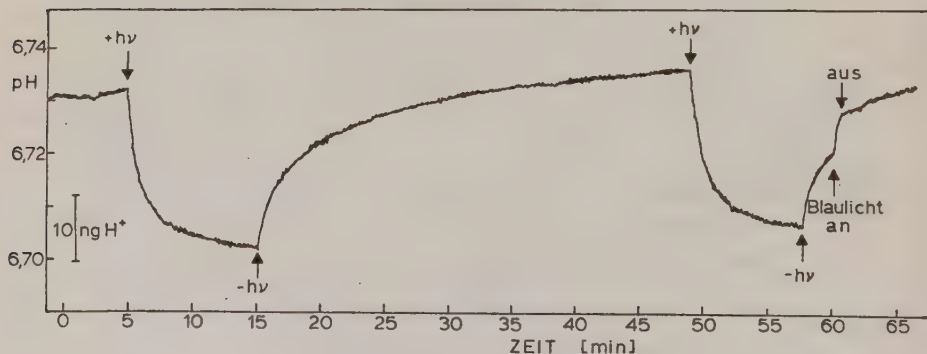


Abb. 23: Reversible Protonenabgabe und -aufnahme des Halorhodopsins (24 nMol/ml) bei Belichtung (150 W, OG 515-Filter). Die pH-Änderungen während der Rückbildung des HR_{580} wurden in einer thermostatisierten Küvette gemessen (siehe Oesterhelt und Hess, 1973). Die Regenerierung des HR_{580} unter Protonenaufnahme wurde durch Blaulicht beschleunigt (siehe auch Abb. 22).

Einflüsse auf die Bildung des L_{HR410} und
die Quantenausbeute seiner Bildung

Weitere Untersuchungen sollten klären, welche Faktoren die Bildung des L_{HR410} beeinflussen. Durch Dialyse der Halorhodopsinprobe gegen 1 M Natriumchlorid bei pH 7 wurden niedermolekulare Stoffe wie Azid, MOPS-Puffer sowie Überschuß an Detergenz entfernt und die Belichtung bei 5°C unter sonst gleichen Bedingungen wiederholt. Der 410 nm-Chromophor bildete sich nicht mehr, d.h. eine der Substanzen, und zwar das Azid, war für die Reaktion verantwortlich. Tabelle III zeigt den Einfluß verschiedener Anionen auf die Bildung des L_{HR410} . Nur drei der untersuchten Anionen konnten die Bildung des blauverschobenen Photoprodukts induzieren: Azid, Cyanat und Sulfid. Die Bindungskonstanten wurden für Azid ($K_D = 54$ mM) und Cyanat ($K_D = 71$ mM) bestimmt (Abb. 24), während steigende Mengen an Sulfid in der Lösung keine Sättigung des Effekts ergaben und zur Denaturierung des Chromophors führten. Gemeinsam ist diesen einwertigen Anionen, daß sie Salze schwacher Säuren sind (pK_s zwischen 3,5 - 7). Es ist denkbar, daß sie deshalb eine Deprotonierungsreaktion im Halorhodopsin als undissoziierte Säuren erleichtern (siehe Diskussion).

Tabelle III: Anionenabhängigkeit der Bildung des L_{HR410} .

Anion (10 mM)	pK der Säure	L_{HR410} -Bildung
Azid	4,72	+
Rhodanid	0,85	-
Hydrogencarbon.	6,35/ 3,88	-
Sulfid	6,99/ 12,9	+
Cyanid	9,31	-
Bromid	<1	-
Jodid	<1	-
Fluorid	3,17	-
Nitrat	3,29	-
Citrat	3,13/4,76/6,4	-
Acetat	4,76	-
Perchlorat	<1	-
Cyanat	3,66	+

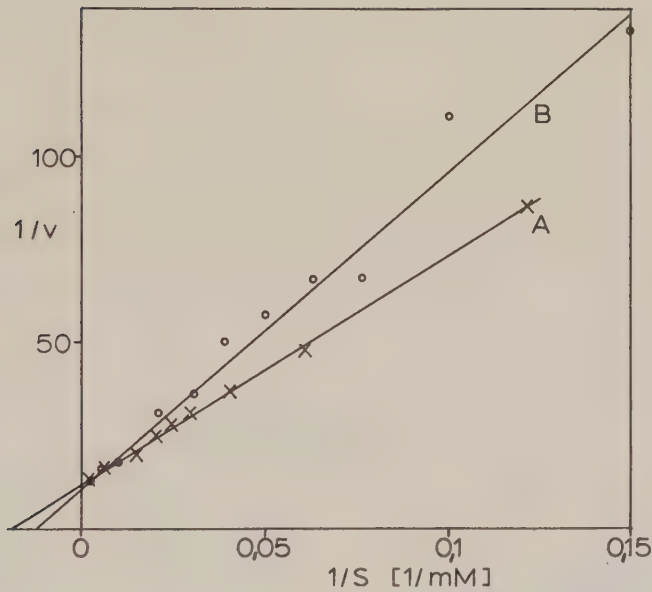


Abb. 24: Bestimmung der Bindungskonstanten von Azid (A) und Cyanat (B) für die Anfangsgeschwindigkeit der L_{HR410} -Bildung (nach Lineweaver-Burk).

Weitere Experimente wurden in Gegenwart von 50 mM Azid durchgeführt. Wie zu erwarten war, wurde eine lineare Beziehung zwischen Halorhodopsinkonzentration und Anfangsgeschwindigkeit der L_{HR410} Bildung gefunden (Abb. 25A). Dagegen wurde keine Abhängigkeit dieser Reaktion von der Konzentration des Detergenz Octylglucosid beobachtet (Abb 25B).

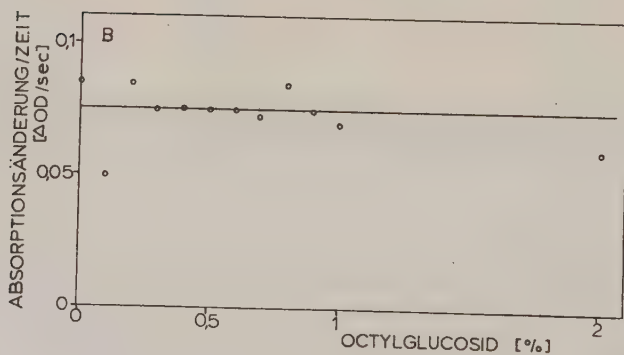
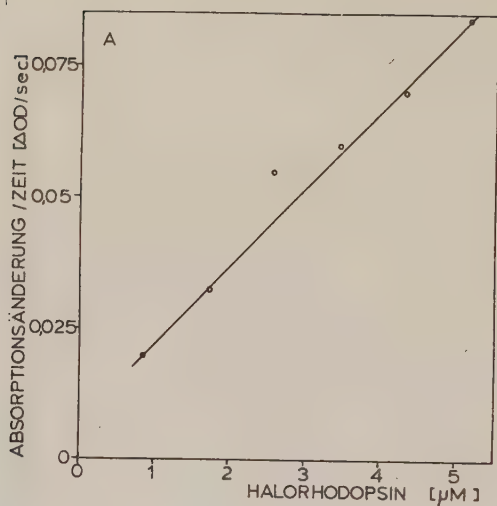


Abb. 25: Effekte der Halorhodopsin-(A) und Octylglucosid-(B) Konzentrationen auf die Anfangsgeschwindigkeit der L_{HR410} -Bildung. Die Messungen in A wurden ohne Octylglucosid und in B bei einer Halorhodopsinkonzentration von $5 \mu\text{M}$ durchgeführt.

Die Anfangsgeschwindigkeit der L_{HR410} -Bildung (Aktivität) wurde als Funktion der Lichtintensität gemessen und ergab eine lineare Beziehung, die zur Ermittlung der Quantenausbeute der Reaktion diente. Hierzu wurde Bacteriorhodopsin unter identischen Bedingungen im Basalsalz-Äther-System gebleicht (Abb. 26) und die Quantenausbeute von 0,79 als Referenz eingesetzt (Oesterhelt und Hess, 1973). Verglichen mit Bacteriorhodopsin war die Quantenausbeute der Bildung des L_{HR410} um den Faktor 20 kleiner, d.h. 0,04.

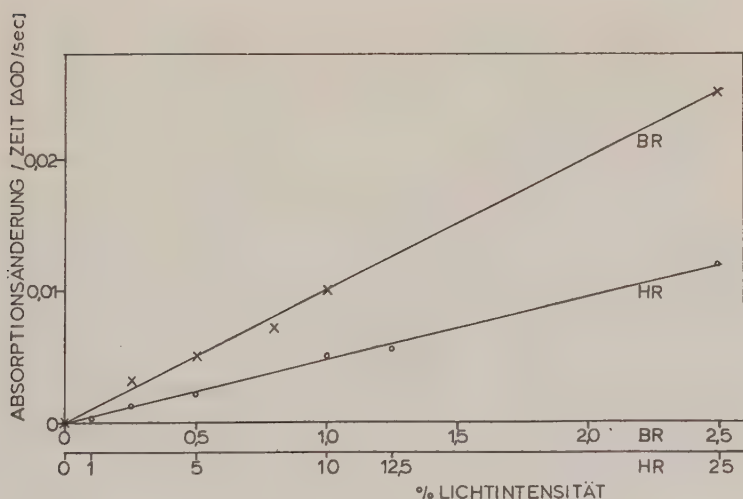


Abb. 26: Bildung des L_{HR410} bzw. des 412 nm Komplexes des BR (Absorptionsänderung bei 410 nm/ Zeit) als Funktion der Lichtintensität. Die Absolutbestimmung der Quantenausbeute von Bacteriorhodopsin wurde von Oesterhelt und Hess (1973) durchgeführt und bei der Bestimmung von zugrunde gelegt.

Wie bereits beschrieben, ist mit der $L_{HR_{410}}$ -Bildung eine Deprotonierung verbunden, die durch einfache Messung nachgewiesen werden konnte. Die Größe der Meßsignale nahm mit steigendem pH-Wert zu (Tabelle IV). Die Deprotonierung des Chromoproteins erfolgte mit einer Stöchiometrie von etwa 2 Protonen pro Chromophor (siehe Diskussion).

Der Versuch einer alternativen Bestimmung der pH-Änderung mit Farbindikatoren erbrachte keine befriedigenden Ergebnisse.

Tabelle IV: pH-Abhängigkeit der Bildung des $L_{HR_{410}}$.

pH	410nm	H ⁺	H ⁺ / 410nm
6,3	0,9	2,9	3,2
6,7	1,9	5,9	3,1
7,0	2,2	5,7	2,6
7,2	2,3	6,4	2,8
7,6	2,4	6,4	2,7
8,1	4,6	8,5	1,9

$\text{HR}_{580}/^{\text{D}}\text{HR}_{410}$ -Gleichgewicht

Die Bildung einer Halorhodopsinspezies $^{\text{D}}\text{HR}_{410}$ wurde in Zellvesikeln im Dunkeln bei hohem pH-Wert beobachtet (Schobert et al., 1983). Ob sie mit $^{\text{L}}\text{HR}_{410}$ identisch ist oder nicht, muß weiteren Versuchen vorbehalten bleiben.

Die Effekte von pH und Chlorid auf das Absorptionsspektrum des Halorhodopsins sind in Abb. 27 gezeigt. Bei pH 6 lag das Chromoprotein fast ausschließlich als HR_{580} vor. Zugabe von Chlorid konnte entsprechend wenig zusätzliche Absorption bei 580 nm bewirken. Innerhalb der Absorptionsbande bei 580 nm wurde jedoch eine Verschiebung von 565 nm nach 577 nm um ca. 10 nm beobachtet, die bereits für Halorhodopsin-haltige Membranen beschrieben wurde (Ogurusu et al., 1981). Eine teilweise Denaturierung des chloridfreien Chromophors (zur Labilität siehe Kap. 3.3.1.) führte zu einer Absorption bei 380 nm, die durch Erhöhung der Chloridkonzentration nicht rückgängig gemacht werden konnte.

Im Gegensatz zu pH 6 stellt sich bei pH 8 in chloridfreien Medium ein Gleichgewicht zwischen dem 580 nm Chromophor und der blauverschobenen Form $^{\text{D}}\text{HR}_{410}$ ein (Abb. 27). Die Absorptionsbanden der beiden Formen haben einen isosbestischen Punkt bei 470 nm und ihr Gleichgewicht hängt von der Chloridkonzentration ab, wobei hohe Chloridkonzentrationen das HR_{580} stabilisiert. Wie bei pH 6 trat innerhalb des HR_{580} die bereits oben erwähnte chloridabhängige Verschiebung des Absorptionsmaximums von 565 nm nach 577 nm auf. Ebenfalls wie bei pH 6 konnte eine Restabsorption bei 380 nm (bedingt durch denaturiertes Chromoprotein) durch

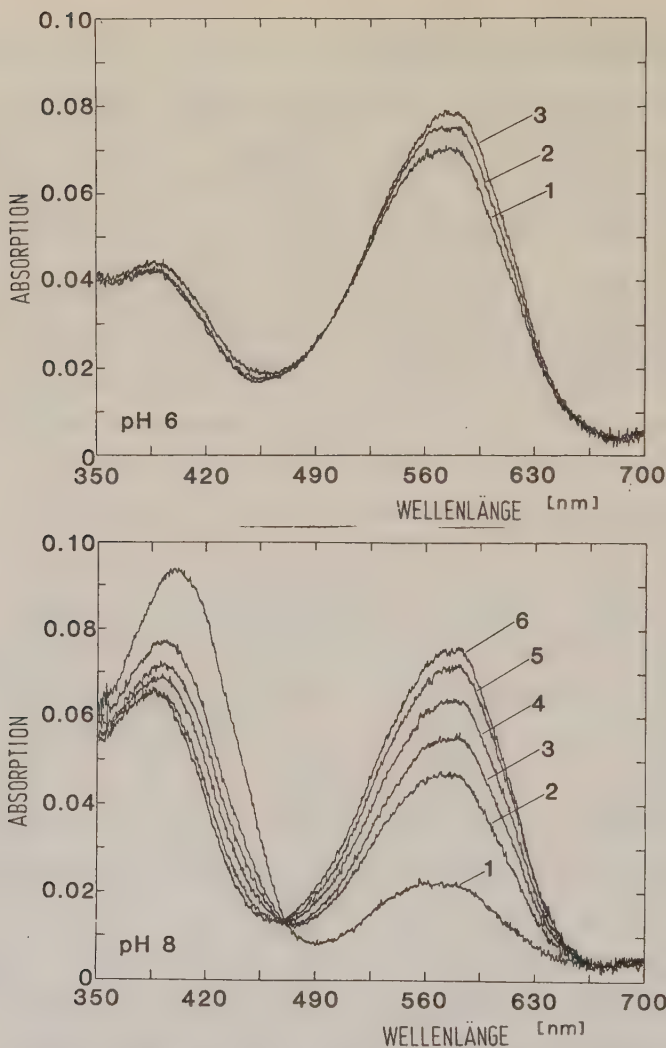


Abb. 27: $\text{HR}_{580}/\text{HR}_{580}$ -Gleichgewicht. Zugabe von Chlorid stabilisiert das HR_{580} . Das Pigment (2 nMol/ml) wurde gegen 0,5 M Na_2SO_4 bei pH 6 (oben) und pH 8 (unten) dialysiert. Folgende Endkonzentrationen an Chlorid wurden durch Zugaben einer 4 M NaCl Lösung erreicht; pH 6 (oben): 1 Null, 2 10 mM, 3 200 mM; pH 8 (unten): 1 Null, 2 10 mM, 3 20 mM, 4 40 mM, 5 100 mM, 6 200 mM. Nach Zugabe von Chlorid zur Probe wurde der Absorptionsbereich der Spektren auf die jeweilige Verdünnung korrigiert.

weitere Zugabe von Chlorid nicht verkleinert werden.

Die chloridinduzierten Absorptionsänderungen bei pH 8 ergeben ein Differenzspektrum (Abb. 28), das mit einem positiven Maximum bei 577 nm und einem negativen bei 420 nm sehr gut mit den chloridabhängigen Absorptionsänderungen, die bereits in Zellvesikeln beobachtet wurden (Lanyi und Schobert, 1983), korrelierte.

Ein Einfluß von Chlorid auf Bacteriorhodopsin unter gleichen Bedingungen (wie in Abb. 27) konnte nicht beobachtet werden.

Da sowohl der Photozyklus von Halorhodopsin als auch die Bildung von L_{HR410} und D_{HR410} starke Anionenabhängigkeit zeigte, wurde eine Untersuchung von Anionenbindungsstellen im Protein durchgeführt.

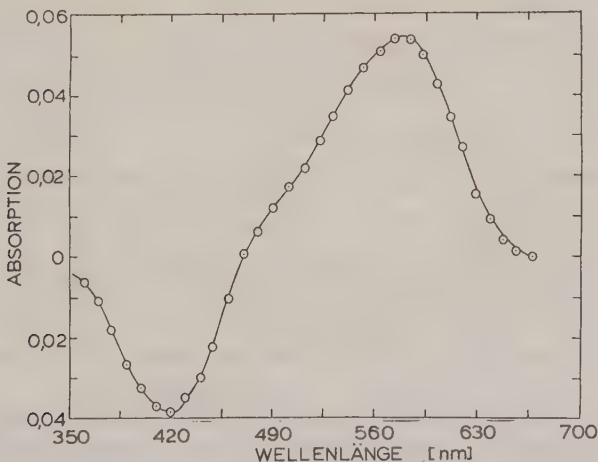


Abb. 28: Differenzspektrum der chloridinduzierten Absorptionsänderungen im Halorhodopsin bei pH 8. Die spektralen Daten der Spektren bei Null und 200 mM Chlorid aus Abb. 27 wurden zur Berechnung verwendet.

3.3.3 Untersuchungen zu Anionenbindungsstellen

Untersuchungen des Halorhodopsins in Zellvesikeln hatten Halogenidbindungsstellen mit einer Bindungskonstanten von 40 mM gezeigt (Schobert et al., 1983). Am gereinigten Halorhodopsin sollten diese Bindungsstellen deshalb ebenfalls gefunden und in verschiedenen experimentellen Anordnungen nachgewiesen werden: a) Versuche zum Photozyklus, b) Quantifizierung des $\text{HR}_{580}/^{\text{D}}\text{HR}_{410}$ -Gleichgewichtes und c) ^{35}Cl NMR Spektroskopie.

Chloridaffinitäten des Halorhodopsins

Der in den vorigen Kapiteln qualitativ beschriebene Effekt des Chlorids auf den Photozyklus und das $\text{HR}_{580}/^{\text{D}}\text{HR}_{410}$ Gleichgewicht wurde quantitativ vermessen. Die blitzinduzierten Absorptionsänderungen bei 500 nm zeigten, daß sowohl die Amplitude der Zerfallsreaktion als auch die Zerfallsrate des Intermediats P_{520} eine Funktion der Chloridkonzentration waren (Abb. 29A). Aus der halbmaximalen Änderung der bei 500 nm gemessenen Amplitude errechnete sich eine Bindungskonstante von 10 mM Chlorid. Obwohl keine Affinitätskonstante für die Zerfallsrate errechnet werden konnte, kann qualitativ festgestellt werden, daß die halbmaximalen Änderungen bei Konzentrationen unter 50 mM Chlorid liegen.

Die Absorptionserhöhung des HR_{580} bei pH 6, 7 und 8 war ebenfalls von der Chloridkonzentration abhängig (Abb. 29B).

Bei allen drei pH-Werten ergab sich aus der halbmaximalen Sättigung des Effekts eine Bindungskonstante für Chlorid von 10 mM.

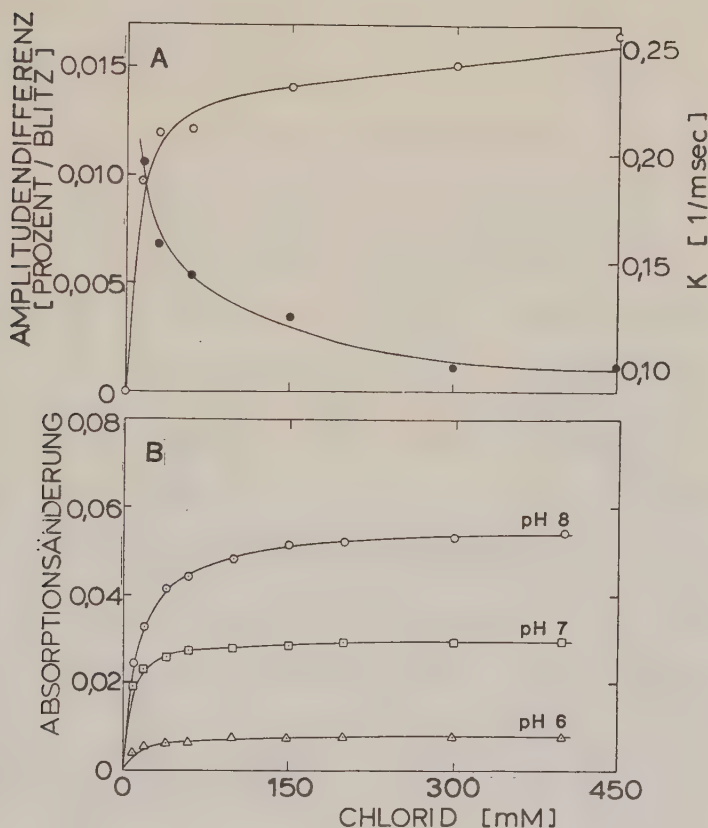


Abb. 29: Chloridabhängigkeit der blitzinduzierten Absorptionsänderungen bei 500 nm (A) und des HR_{580}/HR_{410} -Gleichgewichtes (B) des Halorhodopsins. A: blitzinduzierte Absorptionsänderungen des Halorhodopsins bei 500 nm (wie in Abb. 19). (●—●): Amplitudendifferenz in % pro Blitz; (○—○): Zerfallsrate K des Intermediats P_{520} . B: chloridinduzierte Absorptionsänderung des Halorhodopsins bei 577 nm nach Zugabe von Chlorid bei pH 6, 7 und 8 (wie in Abb. 26).

Halogenid- und andere Anionenaffinitäten des Halorhodopsins

Da Halorhodopsin eine starke Affinität für Chlorid zeigte, wurden weitere Anionen verschiedenen Typs bezüglich ihrer Effekte auf das Chromoprotein untersucht: Halogenide (ohne Fluorid), Pseudohalogenide (Rhodanid), einwertige Anionen und mehrwertige Anionen (Tabelle V).

Die Halogenide induzierten, wie für Chlorid bereits beschrieben, ebenfalls a) die Bildung des P_{520} Intermediats des Photozyklus (Chloridzyklus, siehe Kap. 3.3.1.), b) die Verschiebung des $HR_{580}/{}^DHR_{410}$ -Gleichgewichts und c) die Rotverschiebung in der HR_{580} -Absorptionsbande von 565 nm nach 577 nm. Chlorid und Bromid erwiesen sich dabei als nahezu gleichwertig (Tabelle V). Jodid besaß nur 30 % der Wirksamkeit bezüglich der P_{520} Bildung und gleiche Wirksamkeit im $HR_{580}/{}^DHR_{410}$ -Gleichgewicht (Tabelle V).

Alle anderen untersuchten Anionen konnten dagegen nicht das Intermediat P_{520} des Photozyklus erzeugen, dafür aber die P_{520} Bildung mit einer Wirksamkeit unterbinden, die in folgender Reihe abnahm:

Rhodanid > Fluorid > Nitrat > Acetat > Citrat > Phosphat (Tabelle V), d.h. Pseudohalogenid > einwertiges Anion > mehrwertiges Anion.

Die untersuchten Anionen zeigten bezüglich des Effekts auf den Halorhodopsinchromophor keine erkennbare Regel. Die Verschiebung des $HR_{580}/{}^DHR_{410}$ -Gleichgewichts erfolgte mit einer anderen Affinitätsreihe:

Rhodanid > Phosphat, Nitrat > Acetat > Fluorid > Citrat

Tabelle V: HR_{580}/HR_{410}^D -Gleichgewicht und blitzinduzierte Absorptionsänderungen bei 500 nm im Halorhodopsin,

Anion	HR_{580}/HR_{410}^D -Gleichgewicht			blitzinduzierte Absorptionsänderungen bei 500 nm			Kompetition der Chloridbindung
(200 mM)	K_D mM	Max. Absorptions- änder. bei 580 nm %	λ_{max}^a des 580 nm Chromophors nm	K_D mM	rel. Absorptions- änderung/ Blitz %	rel. Absorptions- änderung/ Blitz %	rel. Absorptions- änderung/ Blitz %
Chlorid	8-12	(100)	577	10	(100)	(100)	
Bromid	8-12	103	577	5-10	99	n.b.	
Jodid	10-14	93	572	5-10	35	n.b.	
Fluorid	-	9	557	-	0	58	
Nitrat	25	73	567	-	0	66	
Rhodanid	13	107	567	-	0	20	
Acetat	-	40	563	-	0	80	
Citrat	-	0	567	-	0	88	
Phosphat	16	73	560	-	0	97	

Halorhodopsin (OD 0,1) wurde gegen 0,5 M Na_2SO_4 / 10 mM MOPS pH 7 (+100 mM NaCl in Kompetitionsexperimenten, letzte Spalte) dialysiert. Die Experimente wurden direkt nach Zugabe des Anions (Endkonzentration 200 mM) durchgeführt. Zur Bestimmung der Bindungskonstanten wurden unterschiedliche Mengen der Anionen (bis 200 mM) zugegeben.

a) Nach Dialyse gegen Sulfat war das Absorptionsmaximum des chloridfreien Halorhodopsins bei 565 nm.

(Tabelle V).

Für die anionenabhängige Rotverschiebung des Chromophors von 565 nm nach 577 nm galt eine wiederum verschiedene Serie:

Chlorid, Bromid > Jodid > Nitrat, Rhodanid, Citrat > Acetat > Phosphat > Fluorid (Tabelle V).

Die in diesen Experimenten gefundenen Affinitätskonstanten (alle ca. 10 mM) wichen von den an Zellvesikeln gefundenen (ca. 40 mM) ab (Lanyi und Schobert, 1983). Aus Stabilitätsgründen wurde bei 5°C für das reine Halorhodopsin nur 0,5 M Sulfat (als Neutralsalz) verwendet, dagegen für Zellvesikel 1,5 M Sulfat bzw. 3 M Phosphat bei Raumtemperatur. Eine schwache Konkurrenz von Sulfat und Phosphat war daher nicht auszuschließen und könnte die Bindungskonstante für Chlorid in Sulfat- bzw. Phosphatlösungen hoher Konzentration scheinbar erhöhen.

MK-473 wurde als kompetitiver Inhibitor des Chloridtransports von Halorhodopsin in Zellvesikeln beschrieben (Schobert et al., 1983). Im isolierten Halorhodopsin wurden jedoch sowohl die blitzinduzierten Absorptionsänderungen als auch die Verschiebung des $HR_{580}/{}^DHR_{410}$ -Gleichgewichts durch Zugabe von MK-473 nicht beeinflusst. Bisher konnte noch keine Erklärung für das Fehlen der inhibitorischen Wirkung im isolierten Halorhodopsin gefunden werden.

Die in diesem Kapitel beschriebenen Experimente (Tabelle V) wurden mit Bacteriorhodopsin wiederholt. Dieses Chromoprotein zeigte weder im Absorptionsspektrum noch in den blitzinduzierten Absorptionsänderungen (gemessen bei 570 nm) irgendwelche Anionenabhängigkeiten.

Untersuchung von Chloridbindungsstellen im Halorhodopsin durch ^{35}Cl NMR Spektroskopie

Mehrere Chloridbindungsstellen im Halorhodopsin wurden mit der ^{35}Cl NMR Methode nachgewiesen, die bereits für viele Untersuchungen von Anionenbindungsstellen anderer Proteine verwendet wurde (Forsen und Lindman, 1981). Als physikalische Grundlage dient der Unterschied der Bandenbreite von proteingebundenem und frei in Lösung befindlichen Chlorid: die Bandenbreite ist für das an ein Makromolekül gebundene Chlorid um $>10^4$ größer als für gelöstes Chlorid. Wegen der großen Bandenbreite und der relativ geringen Menge an gebundenem Chlorid (in den nachfolgend beschriebenen Experimenten ist das Verhältnis der Konzentration von Gesamtprotein/ Gesamtchlorid $< 10^{-3}$) wird die beobachtete ^{35}Cl NMR Resonanz nur durch gelöstes Chlorid bedingt. Findet ein ausreichend schneller Austausch des Chlorids zwischen einer Bindungsstelle und der Lösung statt, so findet eine meßbare Erhöhung der Linienbreite in der beobachteten Resonanz statt (Falke et al., 1983b). Für die Summe aller Proteinmoleküle, die jeweils nur eine einzige Bindungsstelle besitzen, wird die Zunahme der Linienbreite (Linienverbreiterung) durch Gleichung <1> beschrieben (Falke et al., 1983b)

$$\delta_i = [P] \cdot \frac{\alpha_i \cdot n_i}{K_{Di}} \cdot \frac{[\text{Cl}^-]^1}{[\text{Cl}^-]^1 + K_{Di}^{-1}} \quad <1>$$

Dabei ist $[P]$ die Proteinkonzentration, α_i die Proportional-

itätskonstante der i -ten Bindungsstelle, K_{Di} die Dissoziationskonstante des Chlorids der i -ten Bindungsstelle, n_i die Anzahl derartiger Bindungsstellen in einem Proteinmolekül und $[Cl^-]$ die Gesamtchloridkonzentration. Für eine Anzahl identischer Proteinmoleküle, die jeweils mehrere Bindungsstellen besitzen, addiert sich die, durch die verschiedenen Stellen verursachte, Linienverbreiterung und wird mit Gleichung <2> beschrieben (Falke et al., 1983b)

$$\delta = \sum_i \delta_i = [P] \cdot \sum_i \frac{\alpha_i \cdot n_i}{K_{Di}} \cdot \frac{[Cl^-]^{-1}}{[Cl^-]^{-1} + K_{Di}^{-1}} \quad \langle 2 \rangle$$

Gleichung <1> und <2> setzen voraus, daß a) die Konzentration von gebundenen Chlorid gegenüber der relativen Konzentration des freien Chlorids zu vernachlässigen ist und daß b) das gebundene Chlorid vor einer weiteren Bindung an einer anderen Stelle im Proteinmolekül erst wieder frei in Lösung geht.

Die gute Anwendbarkeit der ^{35}Cl NMR Methode beruht auf der Linearität zwischen Linienverbreiterung und der Konzentration der i -ten Bindungsstelle ($= [P] \times n_i$); womit die Linienverbreiterung ebenfalls direkt proportional der Proteinkonzentration ist (Gleichung <1>, <2>). Diese Annahmen konnten experimentell am Halorhodopsin bestätigt werden (Falke et al., 1983a) und zeigten für das Chromoprotein mehrere Arten von Chloridbindungsstellen (Abb. 30). Die Anzahl der Bindungsstellen pro Proteinmolekül (n_i ; Gleichung <1>, <2>) kann derzeit noch nicht für das Halorhodopsinsystem bestimmt werden, da die Konstante α_i

noch unbekannt ist. Trotzdem können die Eigenschaften der beobachteten Bindungsstellen durch die ^{35}Cl NMR Methode gut charakterisiert werden.

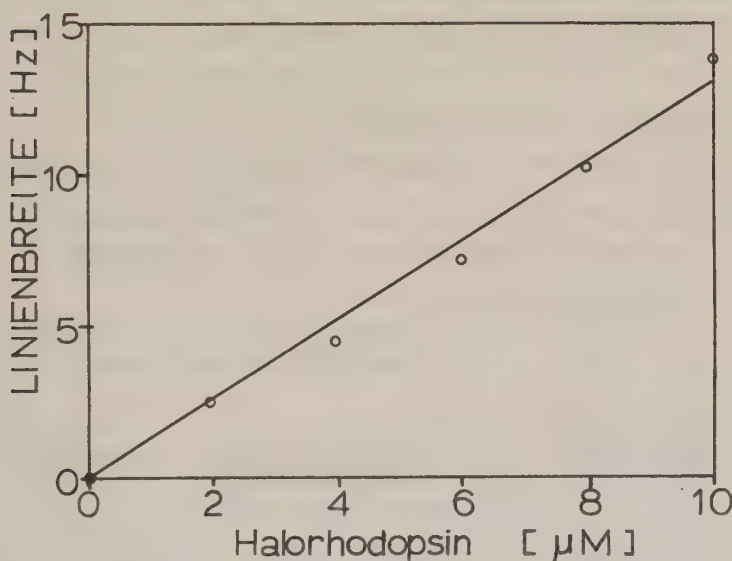


Abb. 30: Einfluß der Halorhodopsinkonzentration auf die Linienbreite im ^{35}Cl NMR Test. Nach Messung der $10\mu\text{M}$ Probe wurden die weiteren Proben durch Verdünnung mit dem NMR Puffer bereit. NMR Puffer: $0,5\text{ M Na}_2\text{SO}_4$, 10 mM MOPS pH 7, $10\text{ \% D}_2\text{O}$, 100 mM NaCl .

Eigenschaften der beobachteten Bindungsstellen:
Chloridaffinität

Die Affinität des Chlorids zum Halorhodopsin wurde durch Zugaben von Chlorid und der daraus resultierenden Linienverbreiterung bestimmt. Entsprechend Gleichung <1> ergibt die graphische Auswertung der Linienverbreiterung gegen die Chloridkonzentration zwei Bindungsstellen

(Abb. 31): a) eine mit hoher Affinität ($K_{Di} = 110 \pm 50$ mM, Bindungsstelle I) und b) eine mit niedriger Affinität ($K_{Di} \gg 1$ M, Bindungsstelle II). Beide Arten von Bindungsstellen konnten wie oben ausgeführt bezüglich der Stöchiometrie nicht charakterisiert werden. Sie besitzen bedeutend höhere K_{Di} -Werte, als durch Messungen in Transportuntersuchungen (Schobert et al., 1983) und den bereits oben diskutierten Chromophoruntersuchungen bestimmt wurde (Steiner et al., 1983). Daher werden diese, durch die ^{35}Cl NMR Spektroskopie nachgewiesenen, Bindungsstellen als NMR-Bindungsstellen bezeichnet.

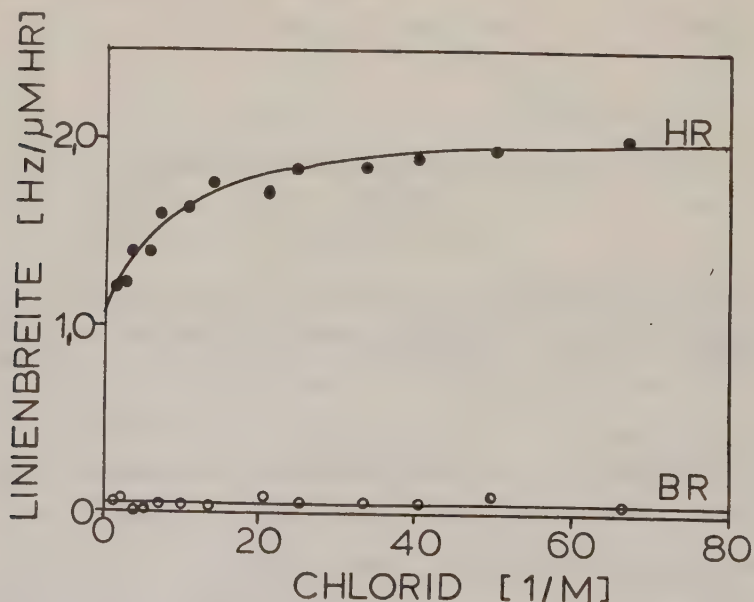


Abb. 31: ^{35}Cl Linienverbreiterung von Halorhodopsin und Bacteriorhodopsin in Abhängigkeit der Chloridkonzentration. Chromoproteinkonzentration: 10 nMol/ml im NMR Puffer: 0,5 M Na_2SO_4 , 10 mM MOPS pH 7, 10 % D_2O .

Affinitäten anderer Anionen für Halorhodopsin

Die NMR-Bindungsstellen können für jedes beliebige Anion charakterisiert werden, das die Chloridbindung kompetitiv inhibiert. Ein derartiges Anion reduziert die Zahl der effektiven Chloridbindungsstellen (n_1 , Gleichung <2>) und damit die beobachtete Linienverbreiterung. Im Halorhodopsin wurde die zur Bindungsstelle I zugehörige Linienverbreiterung durch Zugabe von 800 mM Bromid eliminiert (Abb. 32);

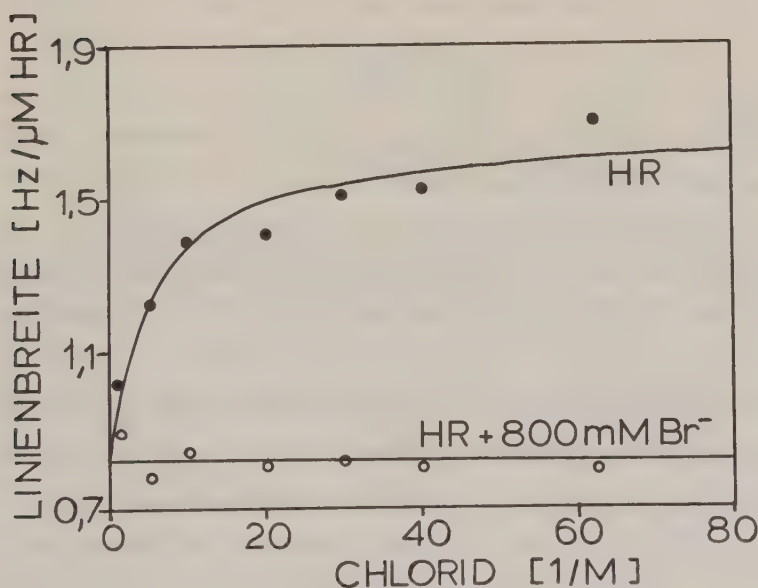


Abb. 32: ^{35}Cl Linienverbreiterung des Halorhodopsins in Abwesenheit und in Anwesenheit von 800 mM Bromid. Die Abbildung gibt nur die Effekte bezüglich der Bindungsstelle I wieder. Halorhodopsinkonzentration: 10 nMol/ml, im NMR Puffer: 0,5 M Na_2SO_4 , 10 mM MOPS pH 7, 10 % D_2O , 100 mM NaCl.

d.h. 800 mM Bromid sättigt die Bindungsstelle und reduziert n_i zu Null. Im Gegensatz dazu wurde die zur Bindungsstelle II zugehörige Linienverbreiterung nicht beeinflusst, da die vorhandene Bromidkonzentration (800 mM) noch keine Sättigung bewirken konnte.

Da Bromid ein kompetitiver Inhibitor für die Bindungsstelle I ist, können diese durch eine Veränderung der Bromidkonzentration bestimmt werden. Wird die Konzentration des kompetitiven Inhibitors X, bei gleichbleibender Halorhodopsin- und Chloridkonzentration, verändert, so ergibt sich für die Linienverbreiterung Gleichung <3> (Falke et al., 1983b)

$$\delta = \delta_H(0) \cdot \left(1 - \frac{[X]}{[X] + K_I(\text{app})}\right) + \delta_L \quad <3>$$

wobei $\delta_H(0)$ die Linienverbreiterung der Bindungsstelle I ohne Inhibitor, δ_L die Linienverbreiterung der Bindungsstelle II und $K_I(\text{app})$ die scheinbare Dissoziationskonstante der Inhibitorbindung bei einer bestimmten Chloridkonzentration ist. Für das Halorhodopsin ergibt die graphische Auswertung der Linienverbreiterung gegen die Bromidkonzentration in 100 mM Chlorid eine scheinbare Dissoziationskonstante für Bromid von 66 ± 5 mM (Abb. 33).

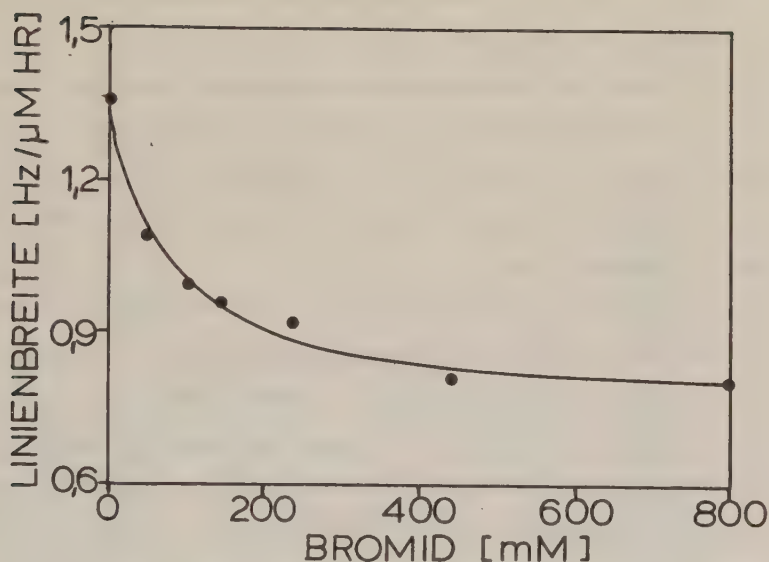


Abb. 33: Einfluß verschiedener Bromidkonzentrationen (bis 800 mM) auf die ^{35}Cl Linienverbreiterung im Halorhodopsin. Chromoproteinkonzentration: 10 nMol/ml, im NMR Puffer: 0,5 M Na_2SO_4 , 10 mM MOPS pH 7, 10 % D_2O , 100 mM NaCl.

Die Effekte weiterer kompetitiver Anionen für die Bindungsstelle I wurde ebenfalls untersucht und in Tabelle VI zusammengefaßt. Die scheinbare Dissoziationskonstante dieser Anionen konnte bezüglich der Anwesenheit von Chlorid mit Gleichung <4> korrigiert werden (Falke et al., 1983b)

$$K_{\text{I}}(\text{app}) = K_{\text{I}} \left(1 + \frac{[\text{Cl}^-]}{K_{\text{Di}}} \right) \quad \langle 4 \rangle$$

wobei K_{I} die wahre Dissoziationskonstante des kompetitiven

Anions und K_{Di} die Dissoziationskonstante der Chloridbindung ($= 100 \pm 50 \text{ mM}$) ist. Diese Ergebnisse (Tabelle VI) ergeben eine Affinitätsreihe der Anionen zur Bindungsstelle I:

Jodid, Rhodanid > Bromid, Nitrat > Chlorid > Fluorid, Citrat

Diese Affinitätsreihe ist ebenfalls verschieden zu den bereits oben vorgestellten Anionenbindungsstellen des Halorhodopsins und unterstreicht daher die Besonderheit der NMR-Bindungsstellen.

Die beschriebene Analyse setzt einen gegenseitigen Wechsel von Chlorid und dem inhibierenden Anion an der Bindungsstelle des Chromoproteins voraus. Ebenso wäre eine andere Erklärung der Inhibierung der Linienverbreiterung durch die Anionen möglich: die Nicht-Chlorid Anionen könnten an eine zweite andere Stelle (als die Bindungsstelle I) binden und deshalb den Chloridaustausch zwischen der intakten Bindungsstelle I und der Lösung verlangsamen. Diese zweite Stelle könnte kein Chlorid binden, da keine Inhibierung der Linienverbreiterung bei hohen Chloridkonzentrationen beobachtet wurde (Abb. 31). Dennoch müßte die zweite Stelle viele von Chlorid verschiedene Anionen (Tabelle VI), sowie die Halogenide Bromid und Jodid, binden. Es ist aber nicht anzunehmen, daß eine Stelle, die sonst relativ unspezifisch bindet, Chlorid ausschließt. Es läßt sich daher schließen, daß die inhibierenden Anionen kompetitive Inhibitoren der Chloridbindung an der Bindungsstelle I sind.

Tabelle VI: Dissoziationskonstanten der Anionenbindung an die Bindungsstelle I (nachgewiesen durch ^{35}Cl NMR).

Anion	Konzentration mM	Wechselwirkung mit der Bindungsstelle I	
		Inhibierung ^a scheinbare ^b korrigierte ^c K_D mM	K_D mM
Chlorid	-	(1)	110 ± 50^d
Jodid	50	0,93	2
Rhodanid	50	0,87	4
Bromid	50	0,48	26
Nitrat	50	0,32	55
Fluorid	50	0,04	>500
Citrat	170	0	>500

^a = Inhibierung der Linienverbreiterung der Bindungsstelle I durch das Anion; ^b = berechnet nach Gleichung <3>, Chloridkonzentration: 100 mM; ^c = berechnet nach Gleichung <4>; ^d = aus Abbildung 31 bestimmt.

pH-Abhängigkeit

Ein Aufschluß über die molekulare Natur der NMR-Bindungsstellen wurde durch die pH-Abhängigkeit der Linienverbreiterung erhalten. Allgemein enthält eine Anionenbindungsstelle mindestens eine durch eine protonierte Gruppe erzeugte positive Ladung. Verschwindet diese notwendige Ladung durch Zugabe von Lauge, so kann Chlorid nicht mehr binden, da die Anzahl der Bindungsstellen pro Proteinmolekül erniedrigt wird (n_1 in Gleichung <2>). Dies hat eine Inhibierung der Linienverbreiterung zur Folge. Die Messung der Linienverbreiterung erfolgte bei einer bestimmten Chloridmenge, die an diese notwendige Ladung bindet und sie stabilisiert, wobei der pK_a jedoch künstlich erhöht wurde. Dennoch läßt sich in diesem Falle ($[Cl^-] = 100 \text{ mM}$, $K_D = 100 \text{ mM}$) die Erhöhung um $< 0,3$ pH vernachlässigen (Falke, 1983b).

Eine Titration der NMR-Bindungsstellen des Halorhodopsins mit Natronlauge in Gegenwart von Chlorid ist in Abb. 34 gezeigt. Die Linienverbreiterung der Bindungsstelle I wird zwischen pH 7 - 11 nicht beeinflusst, aber zwischen pH 11 - 12 erniedrigt und läßt sich später nicht vollständig mit Schwefelsäure rücktitrieren. Diese irreversible Erniedrigung der Linienverbreiterung ist auf eine mögliche Denaturierung und nicht auf eine einfache Deprotonierung zurückzuführen. Folglich bleibt bis pH 11 (bzw. pH 12) die Bindungsstelle I protoniert. Die benötigte positive Ladung der Bindungsstelle wird deshalb eher durch Argininreste als durch Lysinreste erzeugt. Entsprechend bleibt bei pH 12 die

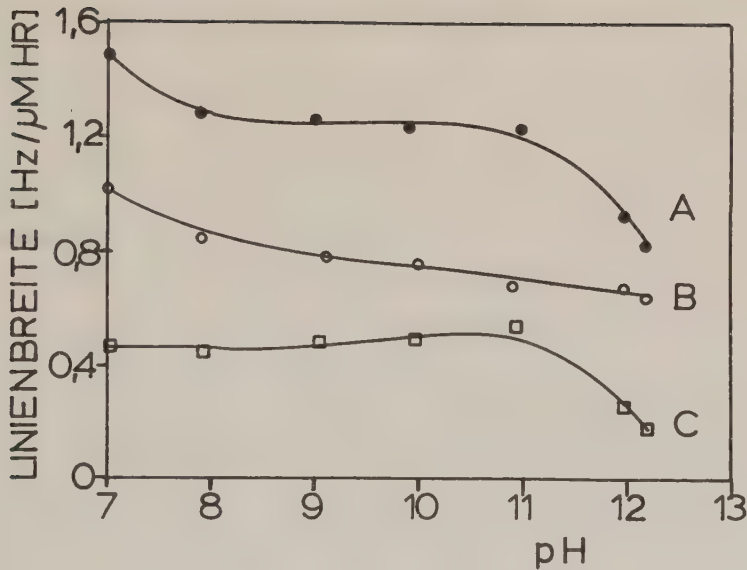


Abb. 34: pH-Abhängigkeit der ^{35}Cl Linienverbreiterung des Halorhodopsins in Abwesenheit (A) und in Gegenwart von 800 mM Bromid (B); Differenz aus A und B (C). Ausgehend von pH 7 wurden die Proben mit NaOH bis pH 12,2 titriert. Chromoproteinkonzentration: 10 nMol/ml, im NMR Puffer: 0,5 M Na_2SO_4 , 10 mM MOPS pH 7, 10 % D_2O , 100 mM NaCl.

Bindungsstelle II protoniert, da auch hier die positive Ladung dieser Bindungsstelle durch Argininreste erzeugt wird.

Bindungsstellen im gebleichten Halorhodopsin

Unter der Annahme, daß die NMR-Bindungsstellen eng mit dem Halorhodopsinchromophor verbunden sind, sollte eine Bleichung des Chromophors einen meßbaren Unterschied in der Linienverbreiterung erzeugen. Die Bleichung des Chromophors in Gegenwart von Chlorid war auf zwei Arten möglich: a) durch Einstellen eines hohen pH-Wertes (siehe Abb. 34) und b) durch eine sehr intensive Belichtung bei neutralem pH-Wert. Beide Methoden der Bleichung des 580 nm Chromophors verursachen eine Deprotonierung der Schiff'schen Base und damit eine Blauverschiebung des Absorptionsmaximums (siehe Kap. 3.3.2.). Während des Experiments wurde unter diesen Bedingungen keine reversible Rückkehr zum Ausgangszustand innerhalb 30 min beobachtet. Die Deprotonierung der Schiff'schen Base beeinflusste nicht die beobachtete Linienverbreiterung und hatte daher keinen Einfluß auf die Bindungsstelle I ($K_D = 135 \pm 50$ mM nach Bleichung) bzw. auf die Bindungsstelle II ($K_D \gg 1$ M nach Bleichung). Aus diesen Ergebnissen folgt, daß beide NMR-Bindungsstellen die Anionen zur Neutralisation der protonierten Schiff'schen Base enthalten.

Bindungsstellen im Bacteriorhodopsin

Bacteriorhodopsin wurde ebenfalls mit ^{35}Cl NMR Spektroskopie untersucht. Für dieses Chromoprotein wurde keine Linienverbreiterung gemessen (Abb. 31). Jedoch wurde beim Bacteriorhodopsin eine Bindungsstelle mit niedriger

Affinität ($K_D = 1 \text{ M}$) für Chlorid und andere Anionen (in der Purpurmembran) bei sehr saurem pH-Wert (pH 1) gefunden. Diese Bindungsstelle läßt sich als Ersatz eines negativen internen Gegenions der Schiff'schen Base durch ein externes Anion interpretieren (Fischer und Oesterhelt, 1979).

Diese Ergebnisse weisen zusammen mit den ^{35}Cl NMR Messungen am Halorhodopsin nochmals darauf hin, daß Halorhodopsin im Gegensatz zu Bacteriorhodopsin für eine Chlorid- und Anionenbindung spezialisiert ist.

3.3.4 Strukturelle Untersuchungen

Konformationsuntersuchungen am Halorhodopsin

Konformationsuntersuchungen an Proteinen können mit CD-Spektroskopie durchgeführt werden, wie z.B. am Poly-Lysin gezeigt werden konnte (Greenfield und Fasman, 1969). Die CD-Spektren des Poly-Lysins verschiedener Konformationen unterscheiden sich grundlegend; d.h. α -Helix-, β -Faltblatt- und ungeordnete Struktur besitzen jeweils eigene charakteristische CD-Spektren. Die Differenzen beruhen auf der unterschiedlichen Anordnung der Peptidgruppen (mit ihrem π -Elektronensystem als wesentlichem Chromophor) in den verschiedenen Konformationen. In erster Näherung läßt sich der α -Helixgehalt eines beliebigen Proteins empirisch bestimmen: Der Wert für die molare Elliptizität pro Aminosäurerest bei 222 nm ($[\theta]_{222}$) beträgt für 100 % α -helicales Poly-Lysin $-33.000 \text{ grad cm}^2 \text{ dezimol}^{-1}$, während er für statistisch geknäultes Poly-Lysin bei etwa Null liegt. Der Beitrag der β -Struktur wird in dieser Methode nicht berücksichtigt. Daher kann durch die Auswertung der CD-Absorption bei 222 nm der α -Helixgehalt nur grob abgeschätzt werden.

Für Bacteriorhodopsin wurde über die Bestimmung von $[\theta]_{222}$ ein α -Helixgehalt von 72 % (Dencher und Heyn, 1978) bzw. 75 % (Long et al., 1977) ermittelt. Dieser Wert korrelierte gut mit den Ergebnissen anderer Strukturuntersuchungen der Purpurmembran, wie Elektronenmikroskopie und Röntgenstruk-

turanalyse, die beide einen α -Helixanteil von 70 - 80 % ergaben (Henderson, 1975; Blaurock, 1975).

Entsprechend wurde der α -Helixanteil des isolierten Halorhodopsins mit CD-Spektroskopie bestimmt (Abb. 35). Die molare Elliptizität pro Aminosäurerest bei 222 nm errechnete sich nach folgender Gleichung (Chen et al., 1972)

$$[\Theta]_{222} = \frac{\Theta}{c_n d}$$

wobei Θ die gemessene Elliptizität (= DC-Absorption x 3300) bei 222 nm, c_n die Mol Aminosäurereste pro Liter und d die Schichtdicke der Probenküvette ist. Zur Berechnung von c_n wurde für Halorhodopsin ein Molekulargewicht von 25.000 Dalton angenommen und daraus folgend bei einem mittleren Aminosäuremolekulargewicht von 110 Dalton 227 Aminosäurereste zugrunde gelegt. Für das Halorhodopsin (in 1 M NaCl/1 % Octylglucosid) errechnete sich eine molare Elliptizität $[\Theta]_{222} = -23.418 \text{ grad cm}^2 \text{ dezimol}^{-1}$, die einem α -Helixgehalt von 65 % entspricht. Die Auswertung von CD-Spektren des Bacteriorhodopsins (aufgenommen unter gleichen Bedingungen wie HR) ergaben einen α -Helixanteil von nur 55 %. Dieser gemessene Wert stimmte aber nicht mit den bekannten Strukturdaten überein (Dencher und Heyn, 1978; Long et al., 1977). In beiden Arbeiten wurden Korrekturfaktoren ermittelt, die die Fehler, verursacht durch Lichtstreuung etc., in den Spektren berücksichtigen. Aus diesem Grund läßt sich die hier gemessene Abweichung durch die gewählten Bedingungen und die Vernachlässigung von Korrekturfaktoren erklären. Für Halorhodopsin ergibt sich daher ein

korrigierter α -Helixgehalt von 85 %, wenn unter Voraussetzung gleicher Korrekturfaktoren Bacteriorhodopsin mit 72 % als Referenz für diese Experimente angesetzt wird (siehe Diskussion).

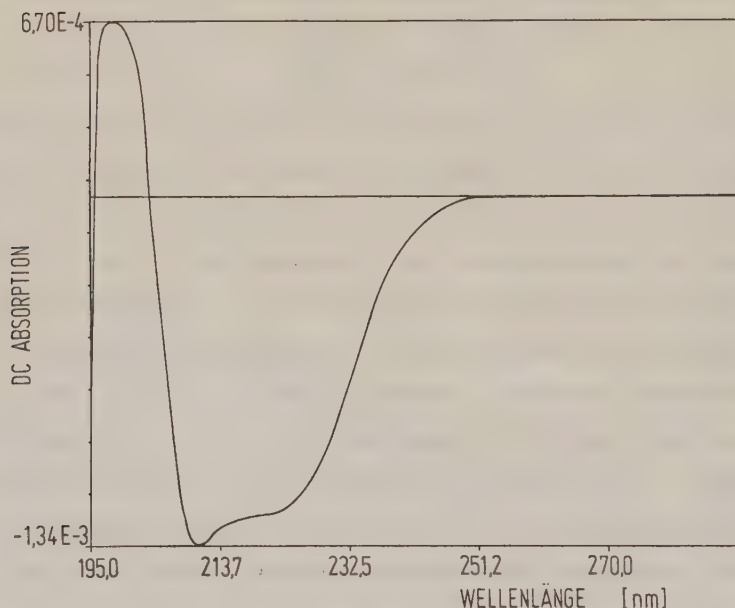


Abb. 35: CD-Spektrum des nativen Halorhodopsins (7,4 nMol/ml) nach 3 h Dialyse gegen 1 M NaCl pH 7; aufgenommen im UV-Bereich zwischen 195 - 270 nm. Schichtdicke der Küvette: 1 mm. Zur Bestimmung des α -Helixgehalts wurde die Elliptizität (= DC-Absorption $\times$ 3300) bei 222 nm zugrunde gelegt.

Bei dieser Strukturanalyse ist zu berücksichtigen, daß verschieden Faktoren erhebliche Abweichungen der Ergebnisse verursachen können: a) ein starker Einfluß des Retinals mit seinem π -Elektronensystem in beiden Chromoproteinen, b) das

bis jetzt noch nicht exakt bestimmte Molekulargewicht und damit die genaue Anzahl der Aminosäurereste, die erst nach vollständiger Sequenzierung des Halorhodopsins bekannt sein wird und c) Einflüsse chemischer Natur, wie die Anwesenheit bestimmter Lösungsmittel und Salze.

Untersuchungen von Proteinen bekannter Raumstruktur ergaben, daß sich die einzelnen Strukturanteile über eine Auswertung der Elliptizität bei verschiedenen Wellenlängen berechnen lassen (Chen et al., 1974). Eine exakte Analyse der gesamten CD-Spektren mit einem entsprechenden Rechenprogramm (Provencher und Glöckner, 1981) müßte daher einen genaueren Aufschluß über die einzelnen Strukturanteile und damit die Konformation des Halorhodopsinmoleküls geben können. Sicher ist jedoch, daß Halorhodopsin einen hohen Anteil der α -Helixstruktur zeigt, wie er für viele Membranproteine gefunden wurde.

Excitonkopplung im Halorhodopsin

In der Purpurmembran liegen die Bacteriorhodopsinmoleküle als Trimere in einem zweidimensionalen hexagonalen Gitter eingebaut vor und beeinflussen sich durch die enge Protein-Protein-Wechselwirkung in ihrer Struktur und Funktion. Diese Wechselwirkung der drei Retinale im Proteincluster erzeugt in CD-Spektren des sichtbaren Bereichs (zwischen 350 - 700 nm) eine starke Excitonkopplung. Bei 535 nm tritt eine positive und bei 600 nm eine negative Absorptionsbande auf. Das Entstehen der Excitonkopplung setzt eine ziemlich starre Anordnung der Bacteriorhodopsinmoleküle, einen kurzen Abstand zwischen den Chromophoren in der Purpurmembran und eine nicht parallele Anordnung der Übergangsdipole zur Membranebene voraus (Heyn et al., 1975; Becher und Ebrey, 1976). Eine Auflösung der Purpurmembran mit einem Detergenz (z.B. Octylglucosid) bei niedriger Ionenstärke (< 100 mM NaCl) monomerisiert die Bacteriorhodopsintrimere unter gleichzeitiger Aufhebung der Excitonkopplung (Dencher und Heyn, 1978). Die verbleibende schwache positive Absorptionsbande im CD-Spektrum mit einem Maximum bei 560 nm dient als Indikator für nicht assoziiertes Bacteriorhodopsin. Aus dieser Lösung läßt sich durch Ultrazentrifugation kein Membranmaterial sedimentieren.

Um das Halorhodopsin unter Erhaltung der Chromophorstruktur nativ zu isolieren, mußte die Tween-gewaschene Membran bei hoher Ionenstärke (> 2 M NaCl) mit einem Detergenz aufgelöst werden. Während der anschließenden Zentrifugation in der

Ultrazentrifuge blieb das violette Material gelöst im Überstand und konnte chromatographisch angereichert werden. Ein CD-Spektrum des gereinigten Halorhodopsins zeigt, statt der erwarteten schwachen Absorptionsbande für ein monomeres Chromoprotein, eine starke Excitonkopplung mit einer positiven Absorptionsbande bei 538 nm und einer negativen bei 606 nm (Abb. 36). Im gelösten Bacteriorhodopsin wurde unter gleichen Bedingungen, d.h. in Detergenz bei hoher Ionenstärke, überraschenderweise ebenfalls eine Excitonkopplung im CD-Spektrum beobachtet. Unter diesen Solubilisierungsbedingungen findet damit keine Monomerisierung des Bacteriorhodopsins statt. Daraus folgt, daß Halorhodopsin ebenfalls nicht monomerisiert und möglicherweise als ein assoziierter Komplex in der Lösung vorliegt. Bis jetzt ist noch keine eindeutige Erklärung dieses Phänomens möglich. Die hohe Ionenstärke bei der Auflösung, bedingt durch die Anwesenheit von 4 M Natriumchlorid, verhindert entweder eine Monomerisierung oder führt nach erfolgter Auflösung der Membran über eine Reaggregation der monomer solubilisierten Chromoproteine zu einem Assoziat. Zukünftige Untersuchungen müssen diese Frage klären.

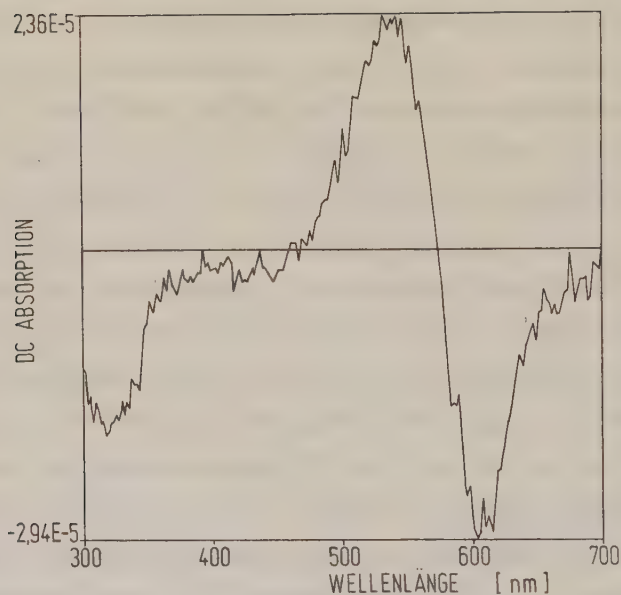


Abb. 36: CD-Spektrum des nativen Halorhodopsins (3 nMol/ml), aufgenommen im sichtbaren Bereich zwischen 300 - 700 nm. Schichtdicke der Küvette: 10 mm; Puffer: 1 % Octylglucosid, 4 M NaCl, 10 mM MOPS pH 7, 0,05 % NaN_3 .

Rekonstitutionsversuche des Halorhodopsins mit Lipiden

Ein wichtiger Aspekt der Charakterisierung von gereinigten Membranproteinen ist der Funktionsnachweis. Dazu wird das Protein in künstliche Membranen (Liposomen, schwarze Lipidmembranen) eingebaut und im Falle des Halorhodopsins, die lichtinduzierten Änderungen des

elektrischen Potentials, bedingt durch den Chloridtransport, an schwarzen Lipidmembranen gemessen (Bamberg et al., 1984). Rekonstitutionsexperimente des Halorhodopsins in künstliche Membranen sind aber auch der Ausgangspunkt für verschiedene Strukturuntersuchungen. Anhand der bekannten Struktur des Bacteriorhodopsins könnten Ähnlichkeiten beider Membranproteine aufgezeigt werden.

Die Purpurmembran besteht neben 75 % Bacteriorhodopsin zu 25 % aus Lipiden. Solubilisierung der Membran durch Detergenzzugabe führt zu Detergenzmicellen mit Protein und Lipid (Helenius und Simons, 1975; Tanford und Reynolds, 1976). Ein Entfernen des Detergenz durch Dialyse sollte, bei einem entsprechenden Protein- zu Lipid-Verhältnis, zu einer Rekonstitution der Membran führen.

Da in der chromatographischen Anreicherung des Halorhodopsins alle Membrankomponenten abgetrennt wurden, sollte das Chromoprotein am Ende nur in Form reiner Detergenz-Protein-Micellen vorliegen. Ein Entfernen des Detergenz durch Dialyse führt zu einer Aggregation von Halorhodopsin (Taylor et al., 1983), während Zugabe von Lipiden und Entfernen des Detergenz zur Membranbildung führen sollte. Deshalb wurde Halorhodopsin (in Puffer C) mit halobacteriellen Lipiden, die ebenfalls in Octylglucosid gelöst wurden, im Verhältnis 1 : 5 bis 1 : 20 gemischt und das Detergenz durch Dialyse gegen eine Natriumchloridlösung ($< 1 \text{ M NaCl}$, pH 7) entfernt. Ein Detergenz zu Lipidverhältnis von 1 : 10 erwies sich in den Versuchen als optimal. In entsprechenden Zeitabständen wurden Proben entnommen und im Elektronenmikroskop

untersucht (Abb. 37). Nach 5 Tagen Dialyse bei 4°C ließen sich im Elektronenmikroskop Strukturen beobachten, die blattförmige Flächen mit Bruchkanten aufwiesen. Eine Kontrollprobe ohne Zugabe von Halobacterienlipid zeigte im Elektronenmikroskop keine membranartigen Strukturen.

Eine längere Dauer der Dialyse führte nach ca. 2 Wochen zu einer Aggregation des Gemisches. Zentrifugation dieses Materials in einem Rohrzuckergradienten zeigte eine violette Zone bei einer Dichte von ca. $1,09 \text{ g cm}^{-3}$.

Alle Versuche wurden mehrfach durchgeführt und ergaben nicht immer die exakt gleichen Resultate, was wohl auf die Qualität des Detergenzaustausches (zweite Phenyl-Sepharose-säule) zurückzuführen war. Notwendig ist aber ein vollständiges Austauschen der Polyoxyäthylendetergenzien (Lubrol PX; Tween 20) gegen Octylglucosid, da sie wegen ihrer niedrigen kritischen Micellenkonzentration nur sehr langsam durch Dialyse zu entfernen sind. Um sichere reproduzierbare Ergebnisse über eine Membranstruktur der Lipid-Halorhodopsin-Assoziate zu erhalten, sollte das Chromoprotein daher in weiteren Ansätzen in anderen Detergenzlösungen angereichert werden. Als Alternative bietet sich das billige Detergenz Decansäure-N-Methylglucamid an, da es sehr ähnliche Eigenschaften wie das Octylglucosid besitzt (Hildreth, 1982) und wegen seiner hohen kritischen Micellenkonzentration durch Dialyse leicht zu entfernen ist.



Abb. 37: Elektronenmikroskopische Auswertung von nativen Halorhodopsinproben. Nach Zugabe von halobacteriellen Lipiden wurde das Detergenz durch Dialyse entfernt. Negative Anfärbung mit Uranylacetat, Primärvergrößerung: 19.600.

3.4 Isolierung eines blauen Cu-bindenden Proteins

Wie bereits in Kap. 3.2.1. erwähnt, wurde bei der Ausarbeitung einer Bestimmungsmethode für das Halorhodopsin ein weiteres Hydroxylamin reaktives blaues Cu-bindendes Protein mit einer Absorption bei 590 nm entdeckt. Aufgabe der vorliegenden Untersuchung war die Isolierung und Charakterisierung des Halorhodopsins. Daher konnte nur ein erster Überblick über die Eigenschaften des blauen Cu-bindenden Proteins gewonnen werden.

Blaue Cu-bindende Proteine

Blaue Cu-Proteine treten in einer Reihe von biologischen Prozessen auf: angefangen vom Elektronentransport (z.B. Azurin) bis zur Oxidation verschiedener Substrate (z.B. Ascorbatoxidase). Allgemein werden blaue Cu-bindende Proteine in drei unterschiedliche Klassen unterteilt (Übersichtsartikel: Malkin und Malmström, 1970; Lappin, 1982): a) Blaue Cu-Proteine des Typs 1 (Azurin, Plastocyanin, Stellacyanin etc.) besitzen nur ein Cu^{2+} -Ion. Sie zeigen eine Absorptionsbande bei 600 nm, ein ESR-Spektrum mit einer kleinen Hyperfine-Kopplungskonstanten und hohe positive Redox-Potentiale. Der Chromophor hat einen Extinktionskoeffizienten zwischen $2.000 - 5.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und ist damit wesentlich größer als in Cu(II) -Komplexen ($<100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). b) Blaue Cu-bindende Proteine des Typs 2

besitzen dagegen mehrere Cu-Zentren (2 - 8 Cu). Sie haben ähnliche Eigenschaften wie die Typ 1 Cu-Proteine und lassen sich ebenfalls mit ESR-Spektroskopie nachweisen. Typische Beispiele für die Typ 2 Cu-Proteine sind Oxidasen wie Ascorbatoxidase (8 Cu), Cytochrom c Oxidase (2Cu/ 2Fe) und Ceruloplasmin (8 Cu). c) Blaue Typ 3 Cu-Proteine (Multicopper Oxidasen) mit mehreren Cu^{2+} -Ionen (Laccase, 4 Cu) zeigen noch eine zweite Absorptionsbande bei 330 nm. Sie sind aufgrund der starken antiferromagnetischen Wechselwirkung zwischen zwei Cu^{2+} -Ionen diamagnetisch. Als ein 2 Elektronen Donor-Akzeptor-Zentrum werden sie für die Reduktion von Sauerstoff benötigt. Weiterhin werden neben diesen drei Cu-Proteintypen nicht-blaue Cu-Proteine gefunden (Galactose Oxidase).

Isolierung des blauen Cu-Proteins aus H. halobium

Die Solubilisierung der L-33 Gesamtmembranfraktion in 1 % Triton X-100 bei pH 4,8 führte zu einer Entfärbung und damit zu einer Denaturierung der beiden retinalbindenden Proteine Halorhodopsin und "Slow cycling Rhodopsin". Die resultierende dunkelgelbe Lösung konnte durch Ionenaustauschchromatographie in verschiedene Membranproteinfraktionen aufgetrennt werden (Abb. 38). Als letzte Fraktion eluierte, nach Abtrennung der meisten Membranproteine, bei hoher Ionenstärke ein blaues Material mit einem Absorptionsmaximum bei 590 nm (siehe Abb. 41). Diese Fraktion erwies sich nach der Analyse des Retinal- und Cu-Gehalts nicht, wie zunächst angenommen, als das native Halorhodopsin, sondern als ein

membrangebundenes Cu-bindendes Protein. In einer zweiten Ionenaustauschchromatographie wurde Triton X-100 gegen Octylglucosid ausgetauscht.

Bei der Bereitung der Tween-gewaschenen Membran aus L-33 Zellen wurde überraschenderweise das Cu-Protein in Tween 20 gelöst und konnte in ersten Versuchen nach Dialyse gegen 1 % Tween 20, 10 mM Na-acetat pH 4,8, 0,05 % NaN_3 ebenfalls mit der gleichen Methode angereichert werden.

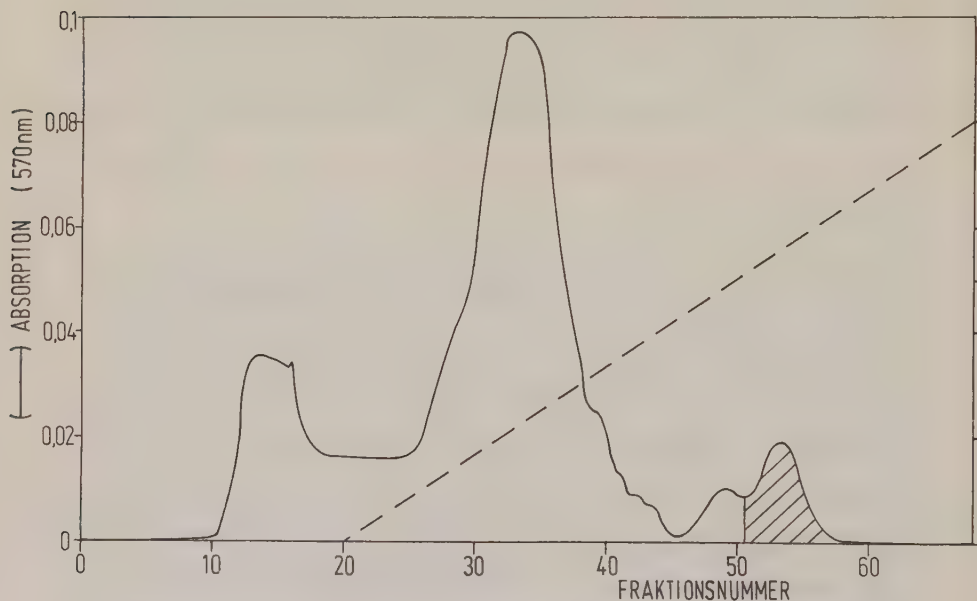


Abb. 38: Ionenaustauschchromatographie von 500 mg Gesamtmembranfraktion, gelöst in 1.000 ml Solubilisierungspuffer, auf DEAE-Sephacel (5 cm x 10 cm). Nicht gebundene Proteine wurden mit dem Solubilisierungspuffer von der Säule gewaschen. Ein Gradient (0 - 0,5 M NaCl im Solubilisierungspuffer) trennte die adsorbierten Proteine und eluierte das blaue Cu-Protein (schraffierte Zone) bei hoher Ionenstärke (0,25 - 0,3 M NaCl). Solubilisierungspuffer: 1 % Triton X-100/ 10 mM Na-Acetat pH 4,8/ 0,05 % NaN_3 .

Das isolierte blaue Material zeigte in SDS-Gelen mehrere Proteinbanden (Abb. 39). Eine Auswertung der SDS-PAGE (Weber und Osborn, 1969) ergab folgende Molekulargewichte der Hauptkomponenten (Abb. 40): 30.000 Dalton (Bande I), 47.000 Dalton (Bande II) und 59.000 Dalton (Bande III). Eine Zuordnung des blauen Cu-bindenden Proteins zu einer dieser Banden war jedoch noch nicht möglich. Als weitere Anreicherungsschritte sind daher Gelfiltration und hydrophobe Chromatographie zu empfehlen.

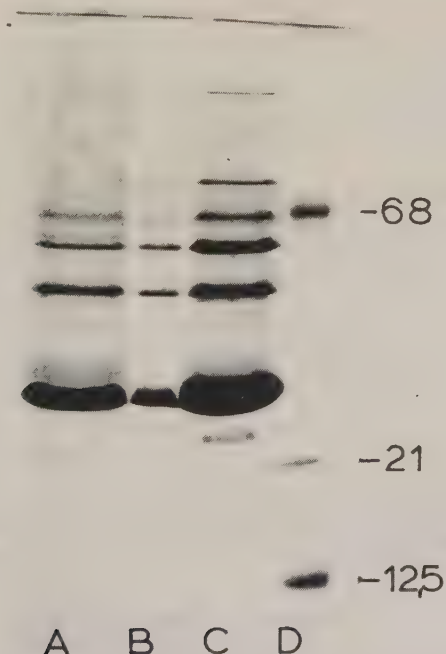


Abb. 39: Analytische SDS-PAGE der blauen Fraktion mit dem Cu-bindenden Protein nach Ionenaustauschchromatographie. Das SDS-Gel wurde mit 10 % Trichloressigsäure fixiert und mit Coomassie R 250 gefärbt. Es wurde zwischen 10 - 70 μ g Protein eingesetzt. A - C: Cu-Proteinfraktion unterschiedlicher Konzentrationen; D: Markerproteine mit ihren Molekulargewichten (siehe Abb. 40).

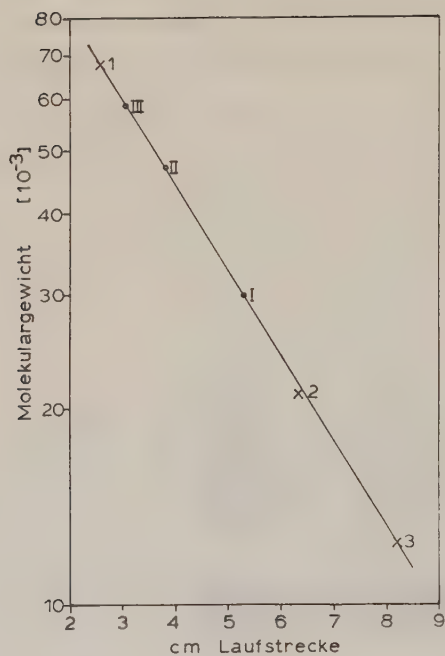


Abb. 40: Auswertung der SDS-PAGE (siehe Abb. 39) mit der blauen Cu-Proteinfraktion (I - III) und Eichproteinen:
1: Rinderserumalbumin (68.000) **2:** Bacteriorhodopsin (21.000)
3: Cytochrom c (12.500).

Eigenschaften des blauen Cu-Proteins

Das Cu-bindende Protein zeigt ein Absorptionsmaximum bei 592 ± 2 nm (Abb. 41). Bei pH-Werten zwischen 3 - 8 trat keine Entfärbung auf; d.h. besonders im sauren pH-Bereich war das Cu-bindende Protein stabil. Zugabe von Reduktionsmitteln wie Dithionit, Borhydrid, Hydroxylamin und Ascorbat führte zu einer sofortigen Entfärbung, die auf die Redoxreaktion des Cu(I)/ Cu(II) im gebundenen Proteinkomplex zurückzuführen war. Über die Titration mit Ascorbat wurde für das blaue Cu-Protein ein molarer Extinktionskoeffizient von $2.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ abgeschätzt. In den isolierten blauen Fraktionen lagen ungefähr 30 % des Kupfers als Cu(I) vor.

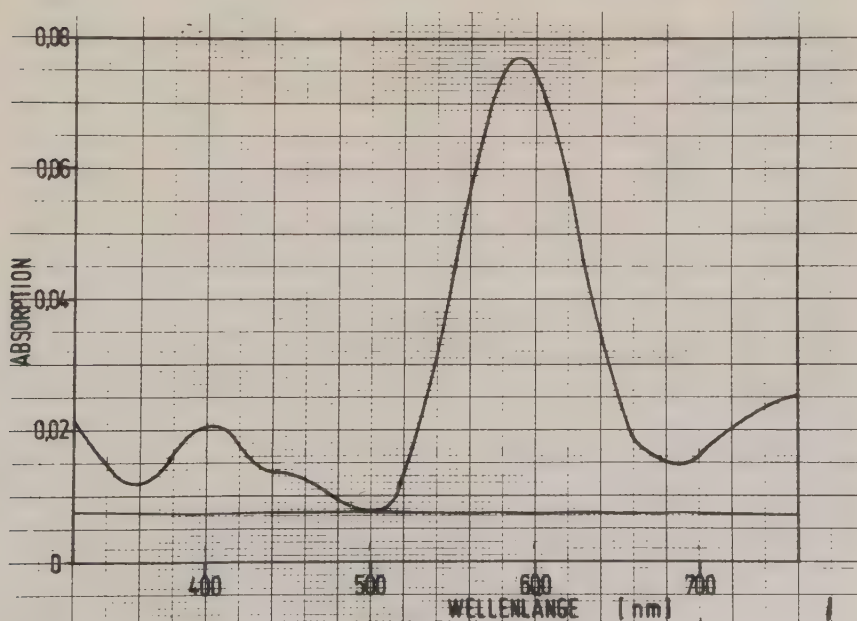


Abb. 41: Absorptionsspektrum der blauen Cu-Proteinfraktion nach Ionenaustauschchromatographie in 0,5 M NaCl/ 1 % Octylglucosid/ 10 mM Na-Acetat pH 4,8/ 0,05 % NaN_3 .

Die Präparation zeigte in ESR-Spektren die für ungepaarte Elektronen typische Absorptionsbande (Abb. 42). Ein Vergleich mit Cu-bindenden Proteinen anderer Organismen zeigte eine hohe Ähnlichkeit zu ESR-Spektren des Plantacyanins aus Cucumis sativus (Aikazyán und Nalbandyan, 1979) und des Rusticyanins aus Thiobacillus ferro-oxidans (Cox et al., 1978). Beide Cu-Proteine enthalten ein Cu-Atom pro Molekül (blaue Typ 1 Cu-Proteine) und funktionieren vermutlich als primäre Elektronenakzeptoren der Fe^{2+} -Oxidation.

Eine physiologische Funktion des blauen Cu-Proteins aus Halobacterium halobium ist schwer erkennbar. Wenn es auch nicht als die Untereinheit II der Cytochrom c Oxidase angenommen werden kann, ist wohl die Beteiligung an einem Redoxprozess, aber nicht der Atmung, anzunehmen.

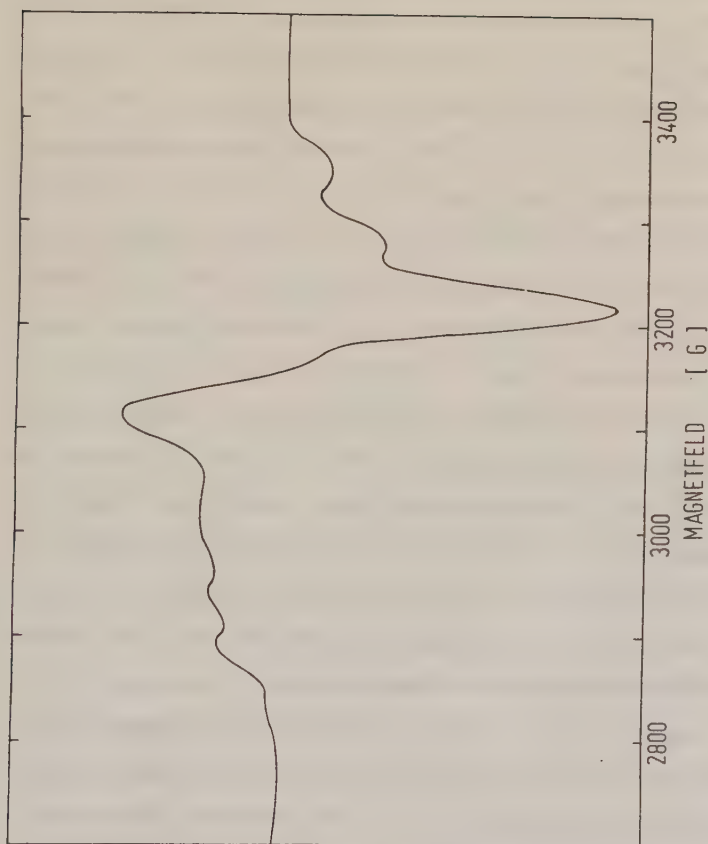


Abb. 42: ESR-Spektrum des blauen Cu-bindenden Proteins aus Halobacterium halobium nach Ionenaustauschchromatographie bei 76 K.

Die Messbedingungen waren: Modulationsamplitude 10 G, Mikrowellenleistung 20 mW, Mikrowellenfrequenz 9,158 GHz, Modulationsfrequenz 100 kHz, Registrierzeit 2 min, Zeitkonstante 0,3 sec.

4. DISKUSSION

Die Beobachtung, daß neben der Protonenpumpe Bacteriorhodopsin noch ein zweites retinalbindendes Protein in Halobacterium halobium vorkommt (Matsuno-Yagi und Mukohata, 1977), war Ausgangspunkt der Untersuchung dieses neuen Chromoproteins Halorhodopsin. Es wurde in anderen Arbeiten (Schobert und Lanyi, 1982; Bamberg et al., 1983) als eine lichtgetriebene Chloridpumpe identifiziert. Um nun das neue Chromoprotein wie das Bacteriorhodopsin in seinen Eigenschaften charakterisieren zu können wurde ein Anreicherungsverfahren erarbeitet.

Bei der Suche nach Mutanten, die kein Bacteriorhodopsin aber eine erhöhte Menge Halorhodopsin synthetisieren, wurden die beiden Stämme L-33 (Wagner et al., 1981) und OD2 (Spudich und Spudich, 1982) gefunden. Die Wachstumsbedingungen dieser Zellen für eine hohe Halorhodopsinproduktion wurden optimiert und erwies sich den Bedingungen für die maximale Bacteriorhodopsinsynthese in Wildtypzellen als ähnlich. Die Versuche zeigten, wie die Halorhodopsinsynthese während des Wachstums von der Sauerstoffmenge und der Belichtung abhängen. Über die molekulare Regulation der Biosynthese des Halorhodopsins auf der Ebene der Transkription oder der Translation ist noch nichts bekannt.

Bacteriorhodopsin kann als natives Pigment einfach isoliert werden, da es in der Purpurmembran, die mehr als 50 % der gesamten Oberfläche der Zellmembran bedecken kann,

kristallisiert. Lyse der Zellen und Membranfraktionierung durch Rohrzucker-Dichtegradientenzentrifugation ergibt große Mengen an reinem Material. Halorhodopsin liegt in nur 100 fach geringeren Konzentrationen in der Zellmembran des Wildtyps vor. Es aggregiert nicht in einem bestimmten Bereich der Membran und ließ sich daher nicht in einer spezifischen Membranfraktion anreichern; d.h. die Methode der Membranfraktionierung entfiel. Im Gegensatz zum Bacteriorhodopsin entfärbte sich der Chromophor des Halorhodopsins sofort während der Solubilisierung der Membran mit Detergenzien bei geringer Ionenstärke. Viele Versuche zur Stabilisierung der Chromophorstruktur, wie z.B. die Anwesenheit von Lipiden in der Detergenzlösung während der Auflösung der Membran (Bock und Fleischer, 1975; Agnew und Raftery, 1979), blieben erfolglos. Als entscheidend für den Erhalt der nativen Struktur erwies sich die Gegenwart des Substrats der Chloridpumpe; d.h. erst in Natriumchloridlösungen höherer Konzentration konnte die Tween-gewaschene Membran mit einem milden Detergenz ohne nennenswerten Farbverlust des Halorhodopsins aufgelöst werden. Eine chromatographische Anreicherung des Proteins war damit möglich, schloß aber, bedingt durch die hohe Salzkonzentration, Methoden wie Gelfiltration, Ionenaustauschchromatographie und verschiedene Arten der Affinitätschromatographie aus. Die Anwesenheit von Salz erwies sich jedoch in der hydrophoben Chromatographie als vorteilhaft und führte, nach einem weiteren Reinigungsschritt über Hydroxylapatitchromatographie, zum gereinigten Halorhodopsin.

Bei der Anreicherung des Halorhodopsins erwies es sich als vorteilhaft, daß der Chromophor des "Slow cycling Rhodopsin" unter den gewählten Bedingungen denaturierte. Daher betreffen die vorliegenden Ergebnisse nur den Chromophor des Halorhodopsins, wie kürzlich durch eine andere Arbeit (Taylor et al., 1983) bestätigt wurde. Eine Kontamination durch das Apoprotein des "Slow cycling Rhodopsin" ist aufgrund der Untersuchungen von Hegemann (1984) auszuschliessen. Jedoch könnte ein anderes Protein mit einem ähnlichen Molekulargewicht von 26.000 Dalton die Präparation verunreinigen (Wieland et al., 1980). Dieses Glykoprotein, daß in sehr geringen Mengen in der Zelle vorhanden ist, wandert in SDS-Gelen etwas langsamer als Bacteriorhodopsin (Sumper, persönliche Mitteilung) und wurde außerdem durch die Hydroxylapatitchromatographie abgetrennt.

Bei der Doppelbande des Halorhodopsins in SDS-Gelen scheint es sich um eine Modifizierung der Polypeptidkette zu handeln, da bis jetzt keine Heterogenität in " der Sequenzanalyse gefunden wurde (Hegemann, 1984). Ein ähnliches Auftreten mehrerer Banden wurde für andere Proteine, wie beispielsweise für die "Methyl-Accepting Chemotaxis Proteins" (MCPs) in Escherichia coli (Hazelbauer und Engstroem, 1981) und für Bacteriorhodopsin (Steiner, 1980) beobachtet. Frühere Untersuchungen von Weber und Osborn (1969) sowie Mescher und Strominger (1976) ergaben ebenfalls, daß Proteine bereits durch Modifikation mit ein oder zwei Methylgruppen eine scheinbare Molekulargewichtserhöhung der Polypeptidkette von ca. 1.000 Dalton zur Folge

haben kann.

Natives Halorhodopsin verhielt sich in Gelfiltrationsexperimenten wie gelöstes Bacteriorhodopsin. Überraschenderweise wurde anhand der Excitonkopplung in CD-Spektren nachgewiesen, daß Bacteriorhodopsin und auch Halorhodopsin in Detergenzlösungen bei hoher Ionenstärke assoziiert vorliegen müssen. Bis jetzt ist noch nicht geklärt, ob Halorhodopsin wie Bacteriorhodopsin als trimere Einheiten in der Zellmembran vorkommt.

Die Strukturuntersuchungen mittels CD-Spektroskopie zeigten einen α -Helixanteil von ca. 85 % im Halorhodopsin, ähnlich wie er im Bacteriorhodopsin gefunden wurde. Dieser Wert basiert auf einer Abschätzung, die lediglich auf der gemessenen Elliptizität bei 222 nm und dem Bacteriorhodopsin als Referenz aufbaut. Korrekturen der Werte (Berücksichtigung der Lichtstreuung etc.) wurden nicht durchgeführt (Dencher und Heyn, 1978; Long et al., 1977). Neuere Untersuchungen am Bacteriorhodopsin mit CD-Spektroskopie und Infrarot-Spektroskopie (Amidbande zwischen 1.600 cm^{-1} und 1.700 cm^{-1}) stellen die allgemein akzeptierte Struktur des Bacteriorhodopsins mit 7 α -Helices in Frage und weisen auf 5 α -Helices und einen höheren Anteil der β -Struktur hin (Jap et al., 1983). Daraus ist ersichtlich, daß noch wesentlich mehr Untersuchungen beider Chromoproteine mit verschiedenen Methoden (Röntgenstrukturanalyse, Elektronenmikroskopie, etc.) notwendig sind, um eine genauere Aussage über die Strukturen zu bekommen.

Weitere Vergleiche von Halorhodopsin und Bacteriorhodopsin

ergaben sowohl Unterschiede als auch überraschende Ähnlichkeiten. Halorhodopsin besitzt eine starke Abhängigkeit des Photozyklus von seinem Substrat: einen Chloridzyklus mit dem Intermediat P_{520} und einen Wasserzyklus mit dem Intermediat P_{660} (Bogomolni et al., 1981; Schobert et al., 1983). Bacteriorhodopsin erwies sich ebenfalls von seinem Substrat, dem Proton, abhängig und zeigt daher Veränderungen in seinem photochemischen Verhalten durch die Verschiebung des pH-Werts (Kalisky und Ottolenghi, 1982; Kobayashi et al., 1983). Damit liegt ein entscheidender Vorteil sämtlicher Untersuchungen des Halorhodopsins gegenüber denen des Bacteriorhodopsins auf der Hand. In wässrigen Lösungen läßt sich das Substrat Chlorid des Halorhodopsins einfach austauschen und alle resultierenden Effekte eindeutig beschreiben. Für Bacteriorhodopsin ist dies schwierig, weil pH-Änderungen im Gegensatz zu Chloridkonzentrationsänderungen auch die Konformation und Oberflächenladung des Proteins verändern und damit Interpretationen des "Substrateffekts" außerordentlich erschweren.

Der Photozyklus des Bacteriorhodopsins wird in Gegenwart von Detergenz und Azid im 10 msec Bereich unverändert durchlaufen. Dagegen wird das Halorhodopsin in seinen photochemischen Eigenschaften unter diesen Bedingungen stark verändert und bildete bei Belichtung ein Photoprodukt mit einem Absorptionsmaximum von 410 nm (L_{HR410}). Die Gegenwart von Anionen wie z.B. Azid führt möglicherweise zu einer Konformationsänderung im Halorhodopsin und erlaubt so die

L_{HR410} -Bildung. Für Bacteriorhodopsin wurde im Basalsalz-Äther-System eine ähnliche Verlangsamung, aber unter Bildung des Intermediats M des Photozyklus, beobachtet (Oesterheld und Hess, 1973). Die Quantenausbeute dieser beiden photochemischen Reaktionen ist im Bacteriorhodopsin um Faktor 20 höher als im Halorhodopsin. In beiden Fällen war die verlangsamte Reaktion von einer reversiblen Protonenabgabe und -aufnahme begleitet. Beide Rückreaktionen ließen sich durch Blaulicht beschleunigen. Dies weist auf Ähnlichkeiten der Retinal-Protein-Wechselwirkung hin.

In seinem chemischen Verhalten ist Halorhodopsin dem Bacteriorhodopsin sehr ähnlich. Beide werden mit Hydroxylamin im Licht unter Retinaloximbildung gebleicht und lassen sich mit Natriumborhydrid im Dunkeln zu einem fluoreszierenden Retinylprotein reduzieren. Die Retinalbindungsstelle im Halorhodopsin ist wahrscheinlich wie im Bacteriorhodopsin die Aminogruppe eines Lysinrestes.

Verschiedene Anionenbindungsstellen wurden im Halorhodopsin nachgewiesen (Steiner et al., 1983; Falke et al., 1983a). Die Existenz von Bindungsstellen für Chlorid läßt sich aus der Sättigung des Chloridtransports in Zellvesikeln schließen (Schobert und Lanyi, 1982; Bamberg et al., 1983). Diese Bindungsstellen stimmen mit den Chloridbindungsstellen des Halorhodopsins gut überein, die in Zellvesikeln anhand der Untersuchungen des Photozyklus und den Eigenschaften des Chromophors nachgewiesen wurden (Lanyi und Schobert, 1983). Beide Arten von Bindungsstellen repräsentieren daher wahrscheinlich den gleichen Typ von Bindungsstelle. Im

gereinigten Halorhodopsin wurden ebenfalls zwei Chloridbindungsstellen mit hoher Affinität ($K_D = 10 \text{ mM}$) jedoch verschiedener Spezifität beobachtet. Bindung von Chlorid (bzw. Halogeniden) an eine Bindungsstelle beeinflusst nur den Photozyklus des Chromoproteins und steht daher wahrscheinlich im Zusammenhang mit dem Transport. Eine andere Bindungsstelle mit einer Vielzahl von Anionen wechselwirkend zeigt eine geringere Spezifität. Diese Anionen haben keinen Einfluß auf den Photozyklus, sondern beeinflussen lediglich die Eigenschaften des Chromophors. Dieser Effekt ist vermutlich auf elektrostatische Wechselwirkungen des Proteins mit den unterschiedlichen Anionen zurückzuführen. Unabhängig davon ließen sich mit ^{35}Cl NMR Spektroskopie zwei weitere Chloridbindungsstellen mit wesentlich geringerer Affinität ($K_D = 110 \pm 50 \text{ mM}$ und $\gg 1 \text{ M}$) nachweisen. Beide NMR-Bindungsstellen haben keinen Einfluß auf den Photozyklus und den Chromophor des Halorhodopsins, da sie beide durch die Bleichung des Halorhodopsins in ihrer Affinität nicht beeinflusst werden. Die benötigte positive Ladung wird durch Arginine gebildet. In diesem Zusammenhang sind Untersuchungen zur Primärstruktur des Halorhodopsins bemerkenswert (Hegemann, 1984), in denen 3 Arginine in einem BrCN-Peptid nachgewiesen wurden.

Durch folgende Modellvorstellung lassen sich diese Ergebnisse erklären: Halorhodopsin besitzt eine hochspezifische Bindungsstelle für Halogenide, die mit dem Photozyklus gekoppelt ist. Diese funktioniert möglicherweise als irreversible Barriere für den Chloridtransport in eine

bestimmte Richtung. Eine zweite weniger spezifische Bindungsstelle im Protein befindet sich in der Nähe des Chromophors. Ein "Kanal" verbindet diese Bindungsstellen mit der Lösung außerhalb des Proteins, die das Substrat Chlorid enthält. Die NMR Bindungsstelle I könnte, am Eingang des Kanals, die Diffusion des Chlorids von außen nach innen zum Transportzentrum ermöglichen. Die NMR Bindungsstelle II liegt wahrscheinlich an der Oberfläche des Proteins und hat vermutlich nur einen geringen Einfluß auf die Transportfunktion im Halorhodopsin. Diese Hypothese deutet auf einen Ionenkanal mit steigender Spezifität für Chlorid zum Transportzentrum hin.

Die Existenz dieser Bindungsstellen macht den funktionellen Unterschied zwischen Halorhodopsin und Bacteriorhodopsin deutlich. Durch die Analysen und den Vergleich der Chromophore beider Proteine mit ihren Änderungen im Licht stellt sich natürlich die Frage, wie zwei Retinalproteine den Ionentransport durch Absorption von Licht betreiben: eines spezifisch für Anionen (Chlorid), das andere für Kationen (Proton).

5. MATERIAL UND METHODEN

5.1 Material

Chemikalien:

Phenyl-Sepharose CL-4B, DEAE-Sephacel: Pharmacia, Uppsala

Hydroxylapatit (Biogel HT): Bio-Rad, Richmond

Tween 20, Lubrol PX, Octylglucosid: Sigma, Taufkirchen

MOPS: Serva, Heidelberg

DNase I (bovine pancreas, grade II): Boehringer, Mannheim

Der Inhibitor MK-473 war ein Geschenk von E.J.Cragoe jr., Merck, Sharp und Dohme Research Laboratories.

Nicht eigens aufgeführte Chemikalien stammten von der Firma Merck, Darmstadt, und besaßen die höchste erhältliche Reinheit.

Lösungen:

Puffer A: 1 % Lubrol PX, 4 M NaCl, 10 mM MOPS pH 7,

0,05 % NaN_3

Puffer B: 4 M NaCl, 10 mM MOPS pH 7, 0,05 % NaN_3

Puffer C: 1 % Octylglucosid, 1 M NaCl, 10 mM MOPS pH 7,

0,05 % Na N_3

Puffer D: 10 mM MOPS pH 7, 0,05 % NaN_3

Für alle Lösungen wurde bidestilliertes Wasser verwendet. Puffer mit hoher Ionenstärke (d.h. >1 M NaCl) für chromatographische Trennungen mußten mit Milliporefiltern ($0,45 \mu\text{m}$) vorgereinigt werden.

5.2 Bakterienzucht

5.2.1 Bakterienstämme

Zur Halorhodopsinisolierung wurde der Halobacterium halobium Stamm L-33 verwendet und ab Juli 1983 die neue Mutante OD2 (von J.Spudich), die einen mehr als doppelt so hohen Halorhodopsingehalt hatte. Zum Vergleich dienten die Stämme L-07 und Flx3. Bacteriorhodopsin wurde aus S9 angereichert.

5.2.2 Zucht der Bakterien

Das Wachstum von Halobacterium halobium erfolgte unter Sauerstoffmangel in Kompletmedium bei 40°C (Oesterhelt und Stoeckenius, 1974). Eine optimale und reproduzierbare Halorhodopsinsynthese konnte mit folgender Vorschrift der Bereitung der Inocula erhalten werden: 35 ml Medium wurden mit einer Platinöse von einer Agar-Stammpalte beimpft und im 100 ml Erlenmeyerkolben bei 100 rpm geschüttelt. Nach 5 Tagen wurden die 35 ml in 700 ml Medium überführt und im 2 l Kolben für weitere 5 Tage unter gleichen Bedingungen bis zu einer Trübung von ca. OD 1,0 bei 578 nm (Zeiss PM-6 Photometer) geschüttelt. Das Animpfen der 10 l Fermenter (NBS, New Brunswick) erfolgte mit 500 ml Stammkultur unter Zugabe eines Antischaummittels (Wackersilicone). Unter Rühren (300 rpm) des Mediums, limitierter Belüftung (2 l/min) und Belichtung (Osram Universal-Weiss 150 W)

erreichte die Kultur nach 90 h die stationäre Phase mit einer OD_{578} von 1,2 und wurde geerntet. Die stationären Bakterienkulturen konnten gegebenenfalls im Kühlraum (4°C) für mehrere Wochen aufbewahrt und erst dann weiterverarbeitet werden.

5.2.3 Wachstumskurve der Bakterienkultur

Einer wachsenden Fermenterkultur wurden 8 ml Aliquote entnommen, 10 min bei 10.000 g abzentrifugiert und in 8 ml Basalsalz pH 7 (Medium ohne Pepton) resuspendiert. Die Halorhodopsinaktivität wurde in Gegenwart von 50 μM CCCP als pH-Änderung nach der Methode von Oesterhelt (1982) gemessen: Nach Einstellen des pH auf $6,8 \pm 0,1$ und 5 min Rühren im Dunkeln wurde die Probe mit einem 150 W Projektor (OG 515-Filter, Schott) in einem zylindrischen, thermostatisierten Gefäß bei 20°C belichtet. Die Anfangsgeschwindigkeit der Protonenaufnahme wurde mit einer Ingold Glaselektrode (Typ LoT 405-M5), die mit einem Knick pH-Meter (Typ 27) und einem Schreiber (Servogor S, Metrawatt) verbunden war, gemessen. Durch Zugabe von definierten Mengen an Säure und Lauge wurde die pH-Änderung kalibriert. Am Ende der Messung wurde durch Zugabe eines Säureüberschusses bei schnellster Schreibergeschwindigkeit die Absolutgeschwindigkeit der Detektion bestimmt, um sicherzustellen, daß die Messung der lichtinduzierten Protonenverschiebung nicht durch die Trägheit des Meßsystems beeinflusst wurde.

5.3 Proteinisolierungen

5.3.1 Isolierung des Halorhodopsins

Lysat

Falls nicht anders angegeben, wurden alle folgenden Operationen für die Anreicherung des nativen Halorhodopsins (Steiner und Oesterheld, 1983) bei Raumtemperatur und schwachen Raumlicht durchgeführt. Die Zellen einer 40 l Kultur wurden 1 h bei 3.000 g in einer präparativen Zentrifuge (Stock, Marburg) abzentrifugiert. Der Zellniederschlag besaß nach gründlichen Entfernen des Überstands ca. 120 g Naßgewicht. Die Zellen wurden mit 400 ml Basalsalz gewaschen (Zentrifugation für 15 min bei 14.000 g und 10°C), in 250 ml Basalsalz mit 5 mg DNase I resuspendiert und über Nacht bei 4°C gegen 10 l destilliertes Wasser dialysiert.

Gesamtmembranfraktion

Zur Abtrennung grober Verunreinigungen wurde das Lysat (ca. 400 ml) 15 min bei 14.000 g und 10°C abzentrifugiert. Die im Überstand befindliche Rohmembran wurde 1 h bei 200.000 g und 10°C pelletiert und in einem Elvehjem Potter in 200 ml 0,1 M NaCl homogenisiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde die Gesamtmembran in 50 - 60 ml 0,1 M NaCl resuspendiert und die Proteinkonzentration auf ca. 7 mg/ml eingestellt.

Tween-gewaschene Membran

60 ml der Gesamtmembranfraktion wurden 30 min mit 180 ml 5 % Tween 20 in Puffer D gerührt (Protein : Tween 20 Verhältnis 1 : 20). Je 24 ml Aliquote wurden in Cellulose-röhrchen eines Kontron TST 28 Ausschwingrotors gefüllt und nacheinander mit 6 ml 25 % Rohrzucker in Puffer D (w/w) und 3 ml 45 % Rohrzucker in Puffer D (w/w) unterschichtet. Nach 14 h Zentrifugation bei 80.000 g und 10°C sammelte sich die gewaschene Membran als tiefrotes Material in der 25 %igen Rohrzuckerlösung. Der Überstand wurde abgesaugt und beide Rohrzuckerphasen mit 0,1 M NaCl auf ein Endvolumen von 250 ml verdünnt. Nach Zentrifugation bei 200.000 g und 10°C wurde das Pellet nochmals mit 100 ml 0,1 M NaCl gewaschen und schließlich in 13 ml der gleichen Lösung resuspendiert. Die Proteinkonzentration betrug ca. 15 mg/ml.

Phenyl-Sepharose Chromatographie

10 ml der Tween-gewaschenen Membran wurden in ca. 120 ml Puffer A durch 30 min Rühren gelöst (Protein : Lubrol PX Verhältnis 1 : 8). Nach 30 min Zentrifugation bei 200.000 g und 10°C trennte sich ein rot-violetter Überstand von einem gelbweissen Niederschlag, der verworfen wurde. Der Überstand wurde auf eine mit Puffer A äquilibrierte Phenyl-Sepharose-säule (5 cm x 5 cm) aufgeschichtet und mit Puffer A eluiert. Das violette Material wurde nicht von der Phenyl-Sepharose retardiert, jedoch in zwei Fraktionen A und B getrennt. Der Hauptanteil der anderen Membranproteine und Pigmente zeigte

eine starke Wechselwirkung mit dem hydrophoben Säulenmaterial und konnte erst durch Waschen mit 1 % Lubrol PX eluiert werden.

Hydroxylapatitchromatographie

Eine Hydroxylapatitsäule (1,6 cm x 2 cm) wurde mit 20 Gelbettvolumina Wasser gewaschen, mit dem gleichen Volumen Puffer A äquilibriert und die vereinigten Fraktionen A und B (170 ml) aufgetragen. Das violette Material wurde nicht adsorbiert und eluierte mit dem Ausschlußvolumen, wogegen gelbes Material erst mit 0,1 M Na-phosphat pH 7 in Puffer A eluiert werden konnte.

Detergenzaustausch

Die vereinigten violetten Fraktionen wurden auf eine zweite mit Detergenz-freiem Puffer B äquilibrierte Phenyl-Sepharose Säule (2,6 cm x 10 cm) aufgetragen und mit 3 Gelvolumen Puffer B gewaschen. Das Halorhodopsin wurde mit 50 ml Puffer C als scharfe Bande eluiert und in einer Amiconzelle konzentriert (YM 10 - Filter) .

Regenerieren der Phenyl-Sepharose

Wiederholte Benutzung der Phenyl-Sepharose setzte eine Regenerierung nach folgendem Schema voraus: Es wurde mit 3 Gelvolumen 1 % Lubrol PX, dann mit gleichen Volumen Wasser, 50 % Ethanol und wieder mit Wasser gewaschen. Nach Entgasen des Gelmaterials wurde die Säule wieder gepackt und mit ca.

600 ml Puffer A äquilibrirt.

5.3.2 Isolierung des Bacteriorhodopsins

Isolierung der Purpurmembran

Die Purpurmembran wurde aus S9-Zellen nach der Methode von Oesterhelt und Stoeckenius (1974) isoliert.

Solubilisierung des Bacteriorhodopsins

Als Referenz für Versuche mit Halorhodopsin wurde die gereinigte Purpurmembran durch 20 h Rühren bei 4°C im Dunkeln in 1 % Octylglucosid, 4 M NaCl und 10 mM MOPS pH 7 gelöst. Nach 1 h Zentrifugation bei 200.000 g und 10°C enthielt der violette Überstand solubilisiertes Bacteriorhodopsin (Steiner und Oesterhelt, 1983). Die Bacteriorhodopsinproben für die Versuche zum Photozyklus und zur ³⁵Cl NMR Spektroskopie wurden analog vorbereitet, jedoch bei Raumtemperatur in 1 M NaCl statt 4 M NaCl.

5.3.3 Zellvesikelbereitung

Zellen einer 15 l Kultur (stationäre Phase) wurden 60 min bei 3.000 g zentrifugiert (Stock Zentrifuge, Marburg). Durch Resuspendieren der Zellen in 400 ml 4 M NaCl und 15 min zentrifugieren bei 14.000 g wurden die Zellen gewaschen. Nach Aufnahme des Niederschlags in 300 ml 4 M NaCl wurden 150 ml Aliquote in einem Kühlgefäß im Eisbad beschallt (Branson sonifier B 15, große Spitze, 50 % Puls mit Stärke 9

für 6 min). Die Zellvesikelbildung konnte im Mikroskop verfolgt werden. Nach 15 min Zentrifugation bei 14.000 g wurde der Vesikelüberstand 1 h lang bei 200.000 g pelletiert, mit 300 ml 4 M NaCl gewaschen und in 20 ml 4 M NaCl resuspendiert. Die Proteinkonzentration betrug 25 mg/ml.

5.3.4 Isolierung eines blauen Cu-bindenden Proteins

DEAE-Sephacelchromatographie

60 ml der L-33 Gesamtmembranfraktion (500 mg Protein) wurden in 940 ml Solubilisierungspuffer (1 % Triton X-100/ 10 mM Na-acetat pH 4,8/ 0,05 % NaN_3) durch 15 min Rühren gelöst (Protein : Triton X-100 Verhältnis 1 : 19). Das solubilisierete Material wurde auf eine im gleichen Puffer äquilibrierte DEAE-Sephacelsäule (5 cm x 10 cm) aufgetragen und mit ca. 300 ml Solubilisierungspuffer nicht adsorbiertes Protein ausgewaschen. Mit einem 0 - 0,5 M NaCl-Gradienten im Solubilisierungspuffer (2 x 1.500 ml) wurden die verschiedenen Proteinspezies aufgetrennt und das Cu-bindende Protein am Ende eluiert.

Detergenzaustausch

350 ml der vereinigten blauen Fraktionen wurden zur Herabsetzung der Ionenstärke 1 : 1 mit dem Solubilisierungspuffer verdünnt und auf eine 2. DEAE-Sephacelsäule (1,6 x 3 cm), die mit dem Solubilisierungspuffer

äquiliibriert war, aufgetragen. Nach Spülen mit 100 ml 10 mM Na-acetat pH 4,8/ 0,05 % NaN_3 wurde das Cu-bindende Protein mit 30 ml 1 % Octylglucosid/ 0,5 M NaCl/ 10 mM Na-acetat pH 4,8/ 0,05 % NaN_3 als scharfe Bande eluiert.

5.4 Spektroskopische Untersuchungen

5.4.1 Absorptionsspektren

Absorptionsspektren wurden mit einem Aminco DW-2 Spektrophotometer aufgenommen. Zur Bestimmung der Konzentrationen wurden Extinktionskoeffizienten von $50.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für Halorhodopsin (Lanyi und Weber, 1980; Steiner und Oesterheld, 1983) und $63.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Oesterheld und Hess, 1973) für Bacteriorhodopsin benutzt.

5.4.2 Spektrophotometrische Tests für Halorhodopsin

Bleichung mit Hydroxylamin im Licht

Der Halorhodopsingehalt von Membranen wurde durch Differenzspektroskopie einer Membranfraktion gegen eine Standardprobe bestimmt, in der Halorhodopsin mit Hydroxylamin im Licht gebleicht wurde: 200 μl Probe wurde mit 1,8 ml 1 % Lubrol PX in Puffer D gemischt und 200 μl 2 M NH_2OH pH 7 zugegeben. Eine Hälfte der Probe wurde mit einer XBO Osram 900 W Xenonlampe ($85 \text{ mW}/\text{cm}^2$, 5 mm KG3

Wärmeschutzfilter und 1 mm OG 515 Filter, Schott) 15 min belichtet. Die andere Hälfte der Probe verblieb im Dunkeln. Aus dem Differenzspektrum wurde der Chromophoranteil der Halorhodopsinprobe errechnet.

Bleichung mit SDS

Alternativ dazu konnte der Chromophorgehalt der Halorhodopsinprobe nach Zugabe von 1 % SDS zur Referenzküvette anhand der Absorptionsabnahme bei 570 nm im Differenzspektrum bestimmt werden (Ogurusu et al.; 1982).

5.4.3 Untersuchungen zum 410 nm Chromophor

Probenvorbereitung für Absorptionsspektren

Experimente zur reversiblen Bleichung des Halorhodopsins und der damit verbundenen Freisetzung von Protonen wurden jeweils mit frisch isolierten Chromoproteinproben nach Detergenzwechsel (2. Phenyl-Sepharosesäule) im Elutionspuffer C eingesetzt. Für Untersuchungen der Anionenabhängigkeiten des lichtabhängigen Chromophorgleichgewichts zwischen 580 nm und 410 nm wurden die Halorhodopsinproben bei 4°C über Nacht gegen ein 200 faches Volumen 1 M NaCl pH 7 dialysiert, um Azid, MOPS-Puffer und den Überschuß an Detergenz zu entfernen. In Titrationsexperimenten wurden, wenn nicht anders angezeigt, die Anionen als 1 M Salze und Octylglucosid aus einer 10 %igen Stammlösung zugegeben.

Reversible Bleichung des Halorhodopsins

In einem Aminco DW-2 Spektrophotometer wurde die Halorhodopsinprobe mit aktinischen Licht (250 W, OG 515, Schott) über einen Lichtleiter reversibel gebleicht. Die Freisetzung von Protonen während der Bildung des 410 nm Chromophors wurde nach der Methode von Oesterhelt und Hess (1973) gemessen. Der Einfluß verschiedener Anionen auf die Blauverschiebung des Chromophors wurde durch die Messung der Anfangsgeschwindigkeit der 410 nm Chromophorbildung bei Belichtung (250 Watt, OG 515) bestimmt. Zur Abschätzung der Quantenausbeute bei der Bildung des L_{HR410} wurde das Bacteriorhodopsin-Basalsalz-Äther-System als Referenz benutzt (Oesterhelt und Hess, 1973).

5.4.4 Untersuchungen zum Photozyklus

Probenvorbereitung

Halorhodopsin wurde für diese Experimente bei 4°C über Nacht gegen ein 200faches Volumen 1 M NaCl/ 10 mM MOPS pH 7 dialysiert, um Azid und Überschuß an Octylglucosid zu entfernen.

Für Untersuchungen von Halorhodopsin und Bacteriorhodopsin in chloridfreien Puffern wurden Proben bei 4°C im Dunkeln gegen 1 l gefiltertes 0,5 M Na₂SO₄, 10 mM MOPS pH 7 mit zwei Wechseln für insgesamt 4 h dialysiert. Die Chromoproteinkonzentration wurde vor der Dialyse auf eine optische Dichte

von 0,1 OD eingestellt, um eine Denaturierung bei späterer Verdünnung mit chloridfreien Puffern zu verhindern. Höhere Konzentrationen an Na_2SO_4 konnten wegen der schlechten Löslichkeit des Salzes bei den tieferen Temperaturen nicht eingesetzt werden. Nach Dialyse wurde mit einer Chloridelektrode eine Chloridkonzentration von weniger als 1 mM bestimmt. Da sich das chloridfreie Halorhodopsin als sehr labil erwies, wurde das Chromoprotein im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt. Die Experimente wurden jedoch bei Raumtemperatur durchgeführt, wobei eine Denaturierung durch Zugabe von 10 - 20 mM Chlorid verhindert werden konnte. In Versuchen in denen eine bestimmte Chloridkonzentration am Ende der Dialyse erwünscht war, wurden entsprechende Mengen NaCl zum Dialysepuffer zugegeben. In Titrationsexperimenten wurden, wenn nicht anders angezeigt, Chlorid und andere Anionen als 4 M Natriumsalze zugegeben. Die Gesamtionenstärke blieb trotz Verdünnung durch die zugegebenen Salzlösungen in allen Versuchen fast konstant. Die Aufnahme von Absorptionsspektren erfolgte bei diesen Experimenten mit einem Gilson Model 2600 Spektrophotometer.

Blitzlichtphotolyse

Untersuchungen zum Photocyclus der Chromoproteine wurden mit einem Kreuzstrahl Blitzlicht-Photometer gemessen (Lanyi und Schobert, 1983; Steiner et al., 1983). Mit der Apparatur konnten Messungen bei verschiedenen Wellenlängen durchgeführt werden. Sie bestand aus einer EJC 250 W Quarz-Halogen Lampe, einem Schoeffel 0,25 m Monochromator

(Meßstrahl) und einer PRA Blitzlampe Model 610 B (aktinischer Strahl). Die Chromoproteinlösung wurde in einer 10 x 10 mm Küvette sowohl vom Meßlicht als auch vom Blitz zentral illuminiert. Der 2-in. EMI 9558 Photomultiplier, geschützt durch eine Interferenzfilterkombination, wurde direkt hinter der Küvette angebracht. Das Signal wurde durch einen Tektronix 3A9 Differential Amplifier verstärkt und gelangte in einen Nicolet 1072 Signal Averager. Dieser wurde mit einer kurzen Verzögerung durch den Triggerpuls (mit dem die Blitzlampe gesteuert wurde) getriggert. Bei einer Blitzdauer von 0,01 msec erfolgte die Meßsignalaufnahme gewöhnlich mit 0,10 msec/ Punkt. Die Blitzenergie betrug 100 μ J/ Blitz (4 oder 5 kV) bei einer Blitzfrequenz von 4 Hz. Halorhodopsinproben (OD 0,1) wurde über 512 Blitze gemittelt, Bacteriorhodopsinproben (OD 0,1) dagegen nur über 128. Für Untersuchungen von blitzinduzierten Absorptionsänderungen bei und unter 570 nm ging das Blitzlicht durch einen 610 nm long-pass Filter. Für Messungen von Absorptionsänderungen über 570 nm ging der Blitz durch eine 570 nm Interferenzfilter- und 580 nm short-pass Filterkombination, unter Schutz des Photomultipliers mit einer Kombination von Interferenz- und cut-off-Filtern. Die blitzinduzierten Absorptionsänderungen werden unverändert gezeigt. Ein kleiner Artefakt (elektrischer Strompuls bei der Blitzentladung) wurde digital abgezogen.

5.4.5 ^{35}Cl NMR Spektroskopie

Probenvorbereitung

Die Chromoproteinproben für die Aufnahme der ^{35}Cl NMR Spektren wurden nach folgendem Schema bereitet: 40 nMol Halorhodopsin bzw. Bacteriorhodopsin wurden in einem Puffer auf 4 ml Endvolumen verdünnt, um eine Endkonzentrationen von 0,5 M Na_2SO_4 ; 10 mM MOPS pH 7; 10 % D_2O ; $\pm$ 100 mM NaCl (NMR Puffer) zu erreichen. Titrationsen mit Chlorid in eine chloridfreie Probe erfolgten durch Zugaben aus einer 4 M NaCl-Lösung und Aufnahme des ^{35}Cl NMR Spektrums für jede neue Chloridkonzentration. Entsprechend wurden Zugaben mit anderen Anionen X^- in eine Halorhodopsinprobe in 100 mM NaCl durch Zugaben aus einer 4 M NaX/ 100 mM NaCl-Lösung durchgeführt und das ^{35}Cl NMR Spektrum für jede neue Anionenkonzentration aufgenommen. Ausnahmen waren Titrationsen mit Fluorid und Citrat, in denen Aliquote aus 1 M NaF/ 100 mM NaCl oder 0,67 M Citrat/ 100 mM NaCl Stammlösungen zugefügt wurden. Die Variation des pH-Werts einer Probe in 100 mM NaCl erfolgte durch Zugabe von 0,2 N NaOH oder 0,1 N H_2SO_4 und anschließender Aufnahme des ^{35}Cl NMR Spektrums. Alle NaX Stammlösungen wurden mit NaOH oder H_2SO_4 auf pH 7 eingestellt.

In einem Experiment wurde eine chloridfreie Halorhodopsinprobe durch 5 min Belichtung mit einer 200 W Hg-Lampe und einem 530 nm long-pass Filter bei 0°C gebleicht. Nach Bleichung wurde Chlorid zur Probe gegeben (wie oben beschrieben) und jedesmal vor Aufnahme eines Spektrums

erneut für 2 min belichtet, um die Irreversibilität der Bleichung sicherzustellen.

^{35}Cl NMR Spektroskopie

Die ^{35}Cl NMR Spektren wurden bei 10°C in einem Varian XL-200 NMR Spektrometer (^{35}Cl Resonanz Frequenz 19,6 MHz) aufgenommen (Falke et al., 1983b). Jedes Probenröhrchen (Durchmesser 10 mm) enthielt 4 ml Probe. Vor Aufnahme der Spektren wurden 1.000 Testscans durchgeführt, um die Temperaturkonstanz der Probe zu überprüfen. Anschließend wurden 1.000- 20.000 Scans aufgenommen, das ^{35}Cl NMR Spektrum aufgezeichnet und die Halbwertsbreite des Absorptionsspektrums per Hand ausgewertet. Die Linienbreite der Probe wurde errechnet als Differenz zwischen der Halbwertsbreite der Probe und des probenfreien Puffers. Die sich durch die Titrationen mit Chlorid und anderen Anionen ergebenden Volumenzunahmen in den Proben wurden später bei den Berechnungen der Anionenkonzentrationen berücksichtigt. Ebenso wurde die Verdünnung des Proteins durch den entsprechenden Faktor korrigiert (Anfangskonzentration des Proteins : verdünnte Proteinkonzentration).

5.4.6 ESR Spektroskopie

Die ESR Spektren des blauen Cu-bindenden Proteins wurden mit einem Varian E-4 Spektrometer bei 9,158 GHz und 76 K aufgezeichnet.

5.5 Chemische Untersuchungen

5.5.1 Reduktion von Halorhodopsin mit Natriumborhydrid

2,5 ml einer Tween-gewaschenen Membran (15 mg/ml) wurden mit 2,5 ml 2 %igen NaBH_4 -Lösung gemischt und für 10 min bei 4°C im Dunkeln gerührt. Nach dreimaligen Waschen mit 10 ml Wasser und 30 min Zentrifugation bei 200.000 g und 4°C wurde die fluoreszierende Probe in 500 μl Wasser resuspendiert. Entsprechend wurde das gereinigte native Halorhodopsin (bis OD 0,5) durch Zugabe einer 2%igen NaBH_4 -Lösung reduziert. Durch 4 h Dialyse im Dunkeln mit 2 Wechseln gegen ein 200faches Volumen Wasser konnte der Überschuß an Natriumborhydrid entfernt werden.

5.5.2 Bleichung von Halorhodopsin mit Hydroxylamin

Zu 900 μl nativer Halorhodopsinlösung (bis OD 1) wurden 100 μl 2 M NH_2OH pH 7 gegeben. Die Probe wurde 15 min bei Raumtemperatur mit einer XBO Osram 900 W Xenonlampe ($85 \text{ mW}/\text{cm}^2$, 5 mm KG3 Wärmeschutzfilter und 1 mm OG 515 Filter, Schott) gebleicht. Die Bleichung der Bacteriorhodopsin-Referenzprobe erfolgte nach der Methode von Oesterhelt et al. (1973).

5.6 Strukturelle Untersuchungen

5.6.1 CD-Spektroskopie

CD-Spektren wurden mit einem Auto. Dichrograph Mark V von ISA Jobin-Yvon aufgenommen und mit einem LEANOR Datenverarbeitungssystem über ein modifiziertes Programm ausgewertet. Die Absorption der Proben lag unter OD 1, um nichtlineare Effekte auszuschließen. Es wurden zylindrische 1 mm (UV) bzw. 10 mm Küvetten (VIS) der Fa. Hellma benutzt. Die gezeigten CD-Spektren ergaben sich nach Subtraktion des Spektrums vom probenfreien Puffer. Vor Aufnahme der CD-Spektren im UV-Bereich wurden die Chromoproteinproben 3 h gegen einen 200 fachen Überschuß 1 M NaCl pH 7 dialysiert.

5.6.2 Rekonstitutionsversuche mit Lipiden

Für Rekonstitutionsversuche wurden 4 µl einer Halobacterienlipidlösung in Chloroform (50 µMol/ml), nach Abdampfen der organischen Phase, in 100 µl 1 % Octylglucosid/ 1 M NaCl bei 60°C gelöst und mit 1 ml einer Halorhodopsinlösung (20nMol/ml) gemischt (HR : Lipid = 1 : 10). Nach Dialyse bei 4°C gegen 500 ml 1 M NaCl pH 7 mit täglichen Pufferwechseln wurden in entsprechenden Zeitabständen Proben für Rohrzuckergradienten-Zentrifugation und elektronenmikroskopische Auswertungen entnommen.

5.6.3 Elektronenmikroskopie

Die Proben wurden für eine Negativkontrastierung mit Uranylacetat präpariert. Dazu wurden Formvar befilmte, Kohle verstärkte und durch eine Glimmentladung (5 min, zur Erzeugung einer hydrophilen Oberfläche) gereinigte Kupfernetzchen verwendet. Die Probe wurde 1 min an die Oberfläche adsorbiert, 20 sec mit bidestilliertem Wasser gewaschen und 20 sec mit einer 1 %igen Uranylacetatlösung kontrastiert. Die elektronenmikroskopische Auswertung erfolgte in einem Jeol Elektronenmikroskop Typ JEM 100 CX mit Objektraumkühlung (fl. N₂) bei 80 kV mit einer Primärvergrößerung von 19.600.

5.7 Analytische Methoden

5.7.1 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Proteinproben wurden in SDS-Gel-Elektrophoresen ausschließlich in Polyacrylamid-Plattengelen mit einem 9- 24 %igen Acrylamid-Konzentrationsgradienten analysiert (Laemmli, 1970; Steiner, 1980).

5.7.2 2-dimensionale Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die Auftrennung von Proteinproben in der 2-dimensionalen Elektrophorese wurde nach den Methoden von O'Farrell (1975) und Pedersen et al. (1976) mit Ampholinen der Fa. LKB durchgeführt.

5.7.3 Gelfiltration

Eine TSK-G 3.000 SW Säule (LKB Ultro Pac, 7,5 mm x 600 mm), die mit einer Gynkotheke Hochdruckpumpe (Modell 600/200) verbunden war, wurde mit 1 % Octylglucosid, 4 M NaCl, 10 mM MOPS pH 7, 0,05 % NaN_3 äquilibriert. 200 μl Chromoproteinlösung wurden über ein Reodyn-Ventil injiziert und mit 6 ml/h bei einem maximalen Druck von 30 bar im gleichen Puffer eluiert.

5.7.4 Proteinbestimmung

Viele Methoden zur Proteinbestimmung versagten in Gegenwart von Detergenz. Eine schnelle Möglichkeit zur Bestimmung der Proteinkonzentration für Membranen und Detergenz-solubilisierter Proben war die nach Warburg und Christian (1942). Jedoch war zu berücksichtigen, daß diese Bestimmung, gegenüber der von Lowry et al. (1951), um einen Faktor 4 zu hoch war. Im Text beziehen sich daher alle Angaben der Proteinkonzentrationen auf die Methode von Warburg und Christian (dividiert durch den Faktor 4).

Teilweise wurden die Proteinkonzentrationen von Zellvesikelsuspensionen auch nach Lowry et al. (1951) mit BSA als Standard bestimmt.

5.7.5 Octylglucosidbestimmung

Octylglucosid wurde durch die Phenol-Schwefelsäure Reaktion für Kohlenhydrate bestimmt (Ashwell, 1966).

5.7.6 Salz-Bestimmung

Die Bestimmung der NaCl-Konzentration erfolgte konduktometrisch (WTW-Conductivity-Meter LBR, Weilheim), jeweils nach Aufnahme einer Eichgeraden mit frischen Standardlösungen oder mit einer Chloridelektrode.

5.7.7 Bestimmung des Cu-Gehaltes

Der Cu-Gehalt des Cu-bindenden Proteins aus Halobacterium halobium wurde anhand der empfindlichen Reaktion mit Cuproin (Bichinolin) bestimmt (Hegemann, 1980). Das Cu-Reagenz hat einen Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{540} = 5.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Da Cuproin nur mit Cu^{+1} reagiert, wurde NH_2OH als Reduktionsmittel zugegeben.

6. LITERATUR

Agnew, W.S. and Raftery, M.A. (1979) Solubilized tetrodotoxin binding component from the electroplax of electrophorus electricus; stability as a function of mixed lipid-detergent micelle composition. *Biochem.* 18, 1912-1919

Aikazyan, V.T. and Nalbandyan, R.H. (1979) Copper-containing proteins from *Cucumis sativus*. *FEBS Lett.* 104, 127-130

Albertsson, P.A. and Andersson, B. (1981) Separation of membrane components by partition in detergent-containing polymer phase systems. *J. Chromat.* 215, 131-141

Ashwell, G. (1966) New colorimetric methods of sugar analysis. *Meth. Enzymol.* 8, 85-95

Bamberg, E., Hegemann, P. and Oesterhelt, D. (1983) Reconstitution of the light-driven electrogenic ion pump halorhodopsin in black lipid membranes. *Biophys. Biochim. acta*, in press

Bamberg, E., Hegemann, P. and Oesterhelt, D. (1984) The 20 kD chromoprotein halorhodopsin is the light-driven chloride pump. in preparation

Bayley, H., Huang, K.-S., Radhakrishnan, R., Ross, A.H., Takagaki, Y. and Khorana, H.G. (1981) Site of attachment of retinal in bacteriorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 2225-2229

Becher, B. and Ebrey, T.G. (1976) Evidence for chromophore-chromophore (exciton) interaction in the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **69**, 1-6

Blaurock, A.E. (1975) Bacteriorhodopsin: a trans-membrane pump containing α -helix. *J. Mol. Biol.* **93**, 139-158

Bock, H.-G. and Fleischer, S. (1975) Preparation of a homogenous soluble D- β -Hydroxybutyrate apodehydrogenase from mitochondria. *J. Biol. Chem.* **250**, 5774-5781

Bogomolni, R.A., Baker, R.A., Lozier, R.H. and Stoeckenius, W. (1976) Light-driven proton translocations in *Halobacterium halobium*. *Biochim. Biophys. Acta* **440**, 68-88

Bogomolni, R.A., Belliveau, J.W. and Weber, H.J. (1981) Salt dependent spectral transition of *Halobacterium* pigment P₅₈₈. *Biophys. J.* **33**, 217a

Bogomolni, R. and Spudich, J.L. (1982) Identification of a third rhodopsin-like pigment in phototactic *Halobacterium halobium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 6250-6254

Bordier, C. (1981) Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J. Biol. Chem.* **256**, 1604-1607

Chen, Y.-H., Yang, J.T. and Martinez, H.M. (1972) Determination of the secondary structures of proteins by circular dichroism and optical rotatory dispersion. *Biochem.* **11**, 4120-4131

Chen, Y.-H., Yang, J.T. and Chau, K.H. (1974) Determination of the helix and β -form of proteins in aqueous solution by circular dichroism. *Biochem.* **13**, 3350-3359

Cox, J.C., Aasa, R. and Malmström, B.G. (1978) EPR studies on the blue copper protein, rusticyanin; a protein involved in Fe^{2+} oxidation at pH 2,0 in *Thiobacillus ferro-oxidans*. *FEBS Lett.* **93**, 157-160

Danchazy, Z., Drachev, L.A., Ormos, P., Nagy, K. and Skulachev, V.P. (1978) Kinetics of the blue light-induced inhibition of photoelectric activity of bacteriorhodopsin. *FEBS Lett.* **96**, 59-63

Danon, A. and Stoeckenius, W. (1974) Photophosphorylation in *Halobacterium halobium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 1234-1238

Dencher, N.A. and Heyn, M.P. (1978) Formation and properties of bacteriorhodopsin monomers in the non-ionic detergents octylglucoside and Triton X-100. *FEBS-Lett.* **96**, 322-326

Eisenbach, M. and Caplan, S.R. (1979) The light-driven proton pump of *Halobacterium halobium*: mechanism and function. in *Curr. Topics in Membranes and Transport Vol.12* (Bronner, F. and Kleinzeller, A., eds.) Academic Press, New York, pp. 165-248

Falke, J.J., Chan, S.I., Steiner, M., Oesterhelt, D., Towner, P. and Lanyi, J.K. (1983a) Halide binding by the purified halorhodopsin chromoprotein. II. New chloride binding sites

- revealed by ^{35}Cl NMR. J. Biol. Chem. (submitted)
- Falke, J.J., Pace, R.J. and Chan, S.I. (1983b) J. Biol. Chem. (submitted)
- Fischer, U. and Oesterhelt, D. (1979) Chromophore equilibrium in bacteriorhodopsin. Biophys. J. 28, 211-230
- Forsen, S. and Lindman, B. (1981) Ion binding in biological systems as studied by NMR spectroscopy. in Meth. Biochem. Analysis Vol. 27 (Glück, D., ed.) Interscience Publ. J. Wiley & Sons, New York, pp. 289-486
- Greene, R.V. and Lanyi, J.K. (1979) Proton movements in response to a light-driven electrogenic pump for sodium ions in Halobacterium halobium membranes. J. Biol. Chem. 254, 10986-10994
- Greenfield, N. and Fasman, G.D. (1969) Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. Biochem. 8, 4108-4116
- Hartmann, R. and Oesterhelt, D. (1977) Bacteriorhodopsin-mediated photophosphorylation in Halobacterium halobium. Eur. J. Biochem. 77, 325-335
- Hazelbauer, G.L. and Engstroem, P. (1981) Multiple forms of methyl-accepting chemotaxis proteins distinguished by a factor in addition to multiple methylation. J. Bacteriol. 145, 35-42
- Hegemann, P. (1980) Untersuchungen zur Funktion der Tyrosine

in der Purpurmembran von *Halobacterium halobium*.
Diplomarbeit, Fakultät für Chemie und Pharmazie der
Ludwig-Maximilians-Universität, München

Hegemann, P. (1984) Halorhodopsin, die lichtgetriebene
Chloridpumpe in *Halobacterium halobium*; Untersuchungen zur
Struktur und Funktion. Dissertation, Fakultät für Chemie und
Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität, München

Hegemann, P., Steiner, M. and Oesterhelt, D. (1982) Isolation
and characterization of the retinal-binding component of
halorhodopsin. *EMBO J.* **1**, 1177-1183

Helenius, A. and Simons, K. (1975) Solubilization of membranes
by detergents. *Biochim. Biophys. Acta* **415**, 29-79

Henderson, R. (1975) The structure of the purple membrane
from *Halobacterium halobium*: analysis of the x-ray
diffraction pattern. *J. Mol. Biol.* **93**, 123-138

Henderson, R. (1977) The purple membrane from *Halobacterium*
halobium. *Ann. Rev. Biophys. Bioenerg.* **6**, 87-109

Henderson, R. and Unwin, P.N.T. (1975) Three-dimensional model
of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature*
257, 28-32

Hess, B. and Kuschmitz, D. (1977) The photochemical reaction
of the 412 nm chromophore of bacteriorhodopsin. *FEBS Lett.*
74, 20-24

Heyn, M.P., Bauer, P.-J. and Dencher, N.A. (1975) A natural CD

label to probe the structure of the purple membrane from *Halobacterium halobium* by means of exciton coupling effects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **67**, 897-903

Hildreth, J.E.K. (1982) N-D-Gluco-N-methylalkanamide compounds, a new class of non-ionic detergents for membrane biochemistry. *Biochem. J.* **207**, 363-366

Hjelmeland, L.M. and Chrambach, A. (1981) Electrophoresis and electrofocusing in detergent containing media: a discussion of basic concepts. *Electrophoresis* **2**, 1-11

Hjerten, S. (1978) Fractionation of membrane proteins by hydrophobic interaction chromatography and by chromatography on agarose equilibrated with a water-alcohol mixture of low or high pH. *J. Chromat.* **159**, 85-91

Hjerten, S. and Johansson, (1972) Selektive solubilization with Tween 20 of membrane proteins from *Acholeplasma laidlawii*. *Biochim. Biophys. Acta* **288**, 312-325

Jap, B.K., Maestre, M.F., Hayward, S.B. and Glaeser, R.M. (1983) Peptide-chain secondary structure of bacteriorhodopsin. *Biophys. J.* **43**, 81-89

Kalisky, O. and Ottolenghi, M. (1982) Branching pathways in the photocycle of bacteriorhodopsin. *Photochem. Photobiol.* **35**, 109-115

Kayushin, L.P. and Skulachev, V.P. (1974) Bacteriorhodopsin as an electrogenic proton pump: reconstitution of bacteriorhodopsin proteoliposomes generating $\Delta\psi$ and ΔpH . *FEBS Lett.* **39**,

39-42

Khorana, H.G., Gerber, G.E., Herlihy, W.C., Gray, C.P., Anderegg, R.J., Nihei, K. and Biemann, K. (1979) Amino acid sequence of bacteriorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 5046-5050

Kobayashi, T., Ohtani, H., Iwai, J., Ikegami, A. and Uchiki, H. (1983) Effect of pH on the photoreaction cycles of bacteriorhodopsin. *FEBS Lett.* **162**, 197-200

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685

Lanyi, J.K. (1979) The role of Na^+ in transport processes of bacterial membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **559**, 377-397

Lanyi, J.K. and MacDonald, R.E. (1976) Existence of electrogenic hydrogen ion/ sodium ion antiport in *Halobacterium halobium* cell envelope vesicles. *Biochem* **15**, 4608-4614

Lanyi, J.K. and Oesterhelt, D. (1982) Identification of the retinal-binding protein in halorhodopsin. *J. Biol. Chem.* **257**, 2674-2677

Lanyi, J.K. and Schobert, B. (1983) Effects of chloride and pH on the chromophore and photochemical cycling of halorhodopsin. *Biochemistry* **22**, 2763-2769

Lanyi, J.K. and Weber, H.J. (1980) Spectrophotometric

identification of the pigment associated with light-driven primary sodium translocation in *Halobacterium halobium*. J. Biol. Chem. **255**, 243-250

Lappin, A.G. (1982) Properties of copper "blue" proteins. in metal ions in biol. systems: 13 copper proteins (H. Sigel, ed.), Marcel Dekker Inc., New York, pp. 15-71

Lemke, H.D. and Oesterhelt, D. (1981) Lysine 216 is a binding site of the retinyl moiety in bacteriorhodopsin. FEBS Lett **128**, 255-260

Lindley, E.V. and MacDonald, R.E. (1979) A second mechanism for sodium extrusion in *Halobacterium halobium*: a light-driven sodium pump. Biochem. Biophys. Res. Commun. **88**, 491-499

Long, M.M., Urry, D.W. and Stoeckenius, W. (1977) Circular dichroism of biological membranes: purple membrane of *Halobacterium halobium*. Biochem. Biophys. Res. Comm. **75**, 725-731

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. **193**, 265-275

MacDonald, R.E., Greene, R.V., Clark, R.D. and Lindley, E.V. (1979) Characterisation of the light-driven sodium pump of *Halobacterium halobium*. J. Biol. Chem. **254**, 11831-11838

Malkin, R. and Malmström, B.G. (1970) The state and function of copper in biological systems. in Advances in Enzymol. **33**

(Nord, F.F., ed.) Interscience Publishers, New York, pp. 177-244

Matsuno-Yagi, A. and Mukohata, Y. (1977) Two possible roles of bacteriorhodopsin; a comparative study of strains of *Halobacterium halobium* differing in pigmentation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **78**, 237-243

Matsuno-Yagi, A. and Mukohata, Y. (1980) ATP synthesis linked to light-dependent proton uptake in a red mutant strain of *Halobacterium halobium* lacking bacteriorhodopsin. *Arch. Biochem. Biophys.* **199**, 297-303

Mescher, M.F. and Strominger, J.L. (1976) Purification and characterization of a procaryotic glycoprotein from the cell envelope of *Halobacterium salinarum*. *J. Biol. Chem.* **251**, 2005-2014

Mitchell, P. (1977) Vectorial chemiosmotic processes. *Ann. Rev. Biochem.* **46**, 996-1005

Mukohata, Y., Matsuno-Yagi, A. and Kaji, Y. (1980) in Morishita, H. and Musini, M. (eds.), *Saline Environment*, Bus. Centr. Acad. Sci., Tokyo, pp. 31-37

Mullen, E., Johnson, A.H. and Akhtar, M. (1981) The identification of Lys₂₁₆ as the retinal binding residue in bacteriorhodopsin. *FEBS Lett.* **130**, 187-193

Norberg, P. and Hofsten, B.V. (1970) Chromatography of a halophilic enzyme on hydroxylapatite in 3.4 M sodium chloride. *Biochim. Biophys. Acta* **220**, 132-133

Oesterhelt, D. (1972) Die Purpurmembran aus *Halobacterium halobium*. Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chem. 353, 1554-1555

Oesterhelt, D. (1974) Bacteriorhodopsin as a light driven proton pump. in Membrane Proteins in Transport and Phosphorylation (G.F.Azzone, M.E.Klingenberg, E.Quagliariello, N.Siliprandi, eds.) North-Holland Publishing Comp., Amsterdam, pp. 79-84

Oesterhelt, D. (1975) The purple membrane of *Halobacterium halobium*: a new system for light energy conversion. in Energy Transformation in Biol. Systems, Ciba Foundation, Symposium 31, Amsterdam, Elsevier, pp. 147-167

Oesterhelt, D. (1982) Reconstitution of the retinal proteins bacteriorhodopsin and halorhodopsin. Meth. Enzymol. 88, 10-17

Oesterhelt, D., Hartmann, R., Fischer, U., Michel, H. and Schreckenbach, T. (1975) Biochemistry of a light-driven proton-pump: bacteriorhodopsin. in Proceedings of the 10th FEBS Meeting (Desnuelle, P. and Michelson, A.M., eds.) Paris, pp. 239-251

Oesterhelt, D., Hartmann, R., Michel, H. and Wagner, G. (1978) Light-driven proton translocation and energy conversion by halobacteria. in 29. Colloqu. d. Ges. f. Biol. Chem. Mosbach (G.Schäfer, M.Klingenberg, eds.) Springer Verlag, Berlin, pp.140-151

Oesterhelt,D. and Hess,B. (1973) Reversible photolysis of the purple complex in the purple membrane of Halobacterium halobium. Eur. J. Biochem. 37, 316-326

Oesterhelt,D., Meentzen,M. and Schuhmann,L. (1973) Reversible dissociation of the purple complex in bacteriorhodopsin and identification of 13-cis and all-trans-retinal as its chromophores. Eur. J. Biochem. 40, 453-463

Oesterhelt,D. and Stoeckenius,W. (1971) Rhodopsin-like protein from the purple membrane of Halobacterium halobium. Nature New Biol. 233, 149-151

Oesterhelt,D. and Stoeckenius,W. (1973) Functions of a new photoreceptor membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 2853-2857

Oesterhelt,D. and Stoeckenius,W. (1974) Isolation of the cell membrane of Halobacterium halobium and its fractionation into red and purple membrane. Meth. Enzymol. 31, 667-678

O'Farrell,P.H. (1975) High-resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250, 4007-4021

Ogurusu,T., Maeda,A., Sasaki,N. and Yoshizawa,T. (1981) Light-induced reaction of halorhodopsin prepared under low salt conditions. J.Biochem. (Tokyo) 90, 1267-1273

Ogurusu,T., Maeda,A., Sasaki,N. and Yoshizawa,T. (1982) Effects of chloride on the absorption spectrum and

photoreactions of halorhodopsin. *Biochim. Biophys. Acta* **682**, 446-451

Pedersen, S., Reeh, S.V., Parker, J., Watson, R.J., Friesen, J.D. and Fiil, N.P. (1976) Analysis of the proteins synthesized in ultraviolet light-irradiated *Escherichia coli* following infection with the bacteriophages λ drif 18 and λ dfus-3. *Mol. Gen. Genet.* **144**, 339-343

Provencher, S.W. and Glöckner, J. (1981) Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochem.* **20**, 33-37

Racker, E. and Stoeckenius, W. (1974) Reconstitution of purple membrane vesicles catalyzing light-driven proton uptake and adenosine triphosphate formation. *J. Biol. Chem.* **249**, 662-663

Reynolds, J.A. and Tanford, C. (1970) Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **66**, 1003-1007

Schobert, B. and Lanyi, J.K. (1982) Halorhodopsin is a light-driven chloride pump. *J. Biol. Chem.* **257**, 10306-10313

Schobert, B., Lanyi, J.K. and Cragoe, E.J. (1983) Evidence for a halide binding site in halorhodopsin. *Biochemistry* (in press)

Schreckenbach, T., Walckoff, B. and Oesterhelt, D. (1977) Studies on the retinal-protein interaction in bacteriorho-

dopsin. Eur. J. Biochem. 76, 499-511

Spudich, E.N., Bogomolni, R.A. and Spudich, J.L. (1983) Genetic and biochemical resolution of the chromophoric polypeptide of halorhodopsin. Biochem. Biophys. Commun. 112, 332-338

Spudich, E.N. and Spudich, J.L. (1982) Control of transmembrane ion fluxes to select halorhodopsin-deficient and other energy-transduction mutants of Halobacterium halobium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4308-4312

Steiner, M. (1980) Bacteriorhodopsin und zwei retinalbindende Komponenten in der Purpurmembra von Halobacterium halobium. Diplomarbeit, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität, München

Steiner, M. and Oesterhelt, D. (1983) Isolation and properties of the native chromoprotein halorhodopsin. EMBO J. 2, 1379-1385

Steiner, M., Oesterhelt, D., Arikawa, M. and Lanyi, J.K. (1983) Halide binding by the purified halorhodopsin chromoprotein. I. Effects on the chromophore. J. Biol. Chem. (in press)

Stoeckenius, W., Lozier, R. and Bogomolni, R. (1979) Bacteriorhodopsin and the purple membrane of Halobacteria. Biochim. Biophys. Acta 505, 215-278

Tanford, C. and Reynolds, J. (1976) Characterization of membrane proteins in detergent solutions. Biochim. Biophys. Acta 457, 133-170

- Taylor, M.E., Bogomolni, R.A. and Weber, H.J. (1983) Purification of photochemically active halorhodopsin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**, 6172-6176
- Tsuda, M., Hazemoto, N., Kondo, M., Kamo, N., Kobatake, Y. and Tagawa, Y. (1982) Two photocycles in *Halobacterium halobium* that lacks bacteriorhodopsin. Biochem. Biophys. Res. Comm. **108**, 970-976
- Wagner, G., Oesterhelt, D., Krippahl, G. and Lanyi, J.K. (1981) Bioenergetic role of halorhodopsin in *Halobacterium halobium* cells. FEBS Lett. **131**, 341-345
- Warburg, O. und Christian, W. (1942) Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. Biochem. Zeitschr. **310**, 384-421
- Weber, K. and Osborn, M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. **244**, 4406-4412
- Wieland, F., Dompert, W., Bernhardt, G. and Sumper, M. (1980) Halobacterial glycoprotein saccharides contain covalently linked sulphate. FEBS Lett. **120**, 110-114
- Yoshida, M., Sone, N., Hirata, H., Takeuchi, Y. and Ohno, K. (1975) ATP synthesis catalyzed by purified DCCD-sensitive ATPase incorporated into reconstituted purple membrane vesicles. Biochem. Biophys. Res. Comm. **67**, 1295-1300

7. ABKÜRZUNGEN

ATP	Adenosintriphosphat
BR	Bacteriorhodopsin
BSA	Rinderserumalbumin
CCCP	m-Chlorphenylhydrazon des Mesoxalsäuredi-
CD	Circulardichroismus nitrils
ESR	Elektronenspinresonanz
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
HR	Halorhodopsin
h	Stunde
K_D	Bindungskonstante
Lubrol PX	Polyoxyäthylenglykol-(9,10)-laurylalkohol
$\lambda_{\max}$	Wellenlänge der max. optischen Absorption
M	molar
min	Minute
MK-473	[(6,7-Dichlor-2-cyclopentyl-2-methyl-1-oxo-1,2-dihydroinden-5-yl)oxy]essigsäure
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
NMR	magnetische Kernresonanz
Octylglucosid	n-octyl- β -D-glucopyranosid
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
P_x	Intermediat des Photocyclus
rpm	Umdrehungen pro Minute
Rub	Bacterioruberin (C ₅₀ Carotenoid)

SDS	Natriumlaurylsulfat
sec	Sekunde
SR	"Slow cycling Rhodopsin"
TPP ⁺	Tetraphenylphosphonium Kation
Triton X-100	Polyoxyäthylenglykol-(9,10)-p-octylphenol
Triton X-114	Polyoxyäthylenglykol-(7,8)-p-octylphenol
Tween 20	Polyoxyäthylenglykol-sorbitolestermonolaurat
w	Gewicht

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 1981 bis Oktober 1983 auf Anregung und unter Leitung von Professor Dr. D. Oesterhelt am Max-Planck-Institut für Biochemie durchgeführt.

Herrn Prof. Oesterhelt danke ich sehr herzlich für sein großes Interesse an meiner Arbeit, sowie für seine persönlichen Ratschläge und ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Lanyi danke ich für die Betreuung meiner Arbeit an der University of California und am California Institute of Technology, sowie der EMBO-Organisation für die Vergabe eines Forschungsstipendiums.

Ferner möchte ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen bedanken, die durch praktische Hilfe diese Arbeit unterstützten. In diesem Zusammenhang seien insbesondere genannt: Herr Falke, der die ^{35}Cl NMR Spektren aufzeichnete, Herr Dr. Scheer, der bei der Aufnahme der CD-Spektren behilflich war, Herr Dr. Cammack, der die ESR Spektren aufnahm, sowie Herr Dr. Claviez, der bei den elektronenmikroskopischen Arbeiten mitwirkte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn P. Hegemann für die unzähligen kritischen Diskussionen.

Meinem Großvater Herrn Karl Tenoort danke ich sehr für die Unterstützung dieser Arbeit.

LEBENS LAUF

Name	Michael Steiner
geboren	9. Juni 1955
Eltern	Klaus Steiner, Technischer Angestellter Carola Steiner, geb. Tennoort
1961 - 1963	Haus-Berge-Schule, Essen
1963 - 1965	Georg-Büchner-Schule, Giessen
1965 - 1974	Liebig-Gymnasium, Giessen
1974	Abitur
1974 - 1977	Studium der Chemie an der Universität Stuttgart und Diplomvorprüfung
1977 - 1980	Fortsetzung des Chemiestudiums an der Ludwig-Maximilians-Universität, München und Diplomprüfung
1980 - 1983	Anfertigung der Diplom- und Doktorarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. D. Oesterheld am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried

5. Dezember 1983

